

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 16 FEB 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 M3-007PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05983	国際出願日 (日.月.年) 28. 10. 99	優先日 (日.月.年) 30. 10. 98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12N15/53, 9/02, 1/21, 1/19, 1/15, 5/10, C07K16/40, C12Q1/26, 1/68, G01N33/50, 33/15, 33/566		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社医学生物学研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18. 05. 00	国際予備審査報告を作成した日 30. 01. 01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 9838

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-19	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-19	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-19	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-19

上記請求の範囲に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献に対して進歩性を有する。

文献1: FEBS Letters, 373(1), Oct. 2 1995

Pamela Y. Gasdaska et al., "Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase", p. 5-9

には、ヒトチオレドキシンレダクターゼIのアミノ酸及びDNA配列が記載されているが、ヒトチオレドキシンレダクターゼIIとの相同性は高くなく、XIAP結合活性を有しない。

TENT COOPERATION TREA

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 14 June 2000 (14.06.00)	
International application No. PCT/JP99/05983	Applicant's or agent's file reference M3-007PCT
International filing date (day/month/year) 28 October 1999 (28.10.99)	Priority date (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)
Applicant TOJI, Shingo et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 May 2000 (18.05.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Christelle Croci

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）



出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒 300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1
関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)
[PCT規則44.1]

発送日
(日.月.年) 08.02.00

出願人又は代理人
の書類記号 M3-007PCT

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号
PCT/JP99/05983

国際出願日
(日.月.年) 28.10.99

出願人（氏名又は名称）
株式会社医学生物学研究所

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出
出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる（PCT規則46参照）。
いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。
詳細については添付用紙の備考を参照すること。
どこへ 直接次の場所へ
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22)740.14.35
詳細な手続きについては、添付用紙の備考を参照すること。
2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項（PCT17条(2)(a)）の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
3. ☐ 法施行規則第44条（PCT規則40.2）に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。
☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。
☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。
4. 今後の手続き： 出願人は次の点に注意すること。
優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。
出願人が優先日から30月まで（官庁によってはもっと遅く）国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。
国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名
日本国特許庁（ISA/JP）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員
特 許 庁 長 官

4B 9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続において請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならず、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならず、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/IPEA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 M3-007PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/05983	国際出願日 (日.月.年) 28.10.99	優先日 (日.月.年) 30.10.98
出願人(氏名又は名称) 株式会社医学生物学研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/53, 9/02, 1/21, 1/19, 1/15, 5/10, C07K16/40, C12Q1/26, 1/68, G01N33/50, 33/15, 33/566		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/00-15/90		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ PIR/SWISSPROT/GENESEQ BIOSIS/WPI		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	J. Biol. Chem, 274(35), August 27 1999 Qui-AnSun et al., "Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase", p. 24522-24530	1-17, 19 18
P, X P, A	Eur. J. Biochem., 261(2), April 1999 Antonio Miranda-Vizuetete et al., "Human mitochondrial thioredoxin reductase. cDNA cloning, expression and genomic organization", p. 405-412.	1-17, 19 18
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 25. 01. 00	国際調査報告の発送日 08.02.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内田 俊生 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	FEBS Letters, 442(1), Jan. 8 1999 Pamela Y. et al., "Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase", p. 105-111	1-17, 19 18
P, X P, A	Database Medline on PubMed, US National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), No. 10462449, Gorlatov SN., et al., "Human selenium-dependent thioredoxin reductase from HeLa cells: properties of forms with differing heparin affinities", abstract, Arch. Biochem. Biophys, 369(1), p. 133-142, Sep. 1 1999	1-17, 19 18
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93(3), Feb. 6 1996 Takashi Tamura et al., "A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity" p. 1006-1011	1-19
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(12), June 11 1996 Vadim N. Gladyshev et al., "Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene" p. 6146-6151	1-19
A	FEBS Letters, 373(1), Oct. 2 1995 Pamela Y. Gasdaska et al., "Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase" p. 5-9	1-19
A	J. Biol. Chem, 273(15), Apr. 10 1998 Liangwei Zhong et al., "Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue" p. 8581-8591	1-19
A	GENOMICS, 37(2), Oct. 15, 1996 John R. Gasdaska et al., "Human thioredoxin reductase gene localization to chromosomal position 12q23-q24.1 and mRNA distribution in human tissue", p. 257-259	1-19

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Building 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi
Ibaraki 300-0847
JAPON

RECEIVED
WITH THANKS

6. 26 2000

SHIMIZU PATENT
OFFICE

Date of mailing (day/month/year) 14 June 2000 (14.06.00)		
Applicant's or agent's file reference M3-007PCT		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP99/05983	International filing date (day/month/year) 28 October 1999 (28.10.99)	
		Priority date (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)
Applicant MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
National :JP,US


2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

None

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>Christelle Croci </p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	28.10.99
国際出願日	28.10.99
(受付印)	大領印
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)	M3-007PCT

第 I 欄 発明の名称

チオレドキシシンレダクターゼII

第 II 欄 出願人

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

株式会社医学生物学研究所
MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.
〒460-0002 日本国愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5-10
住友商事丸の内ビル5階
Sumitomo-shoji, Marunouchi Bldg. 5F,
5-10, Marunouchi 3-chome, Naka-ku, Nagoya-shi,
AICHI 460-0002 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☒ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

田路 真悟
TOJI Shingo
〒396-0002 日本国長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063-103
株式会社医学生物学研究所内
c/o MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.
1063-103 Aza Ohara, Oaza Terasawaoka, Ina-shi, NAGANO
396-0002 JAPAN

この欄に記載した者は
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続報に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

10297 弁理士 清水 初志 SHIMIZU Hatsushi
10877 弁理士 橋本 一憲 HASHIMOTO Kazunori
〒300-0847 日本国茨城県土浦市卸町1-1-1
関鉄つくばビル6階
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F,
1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, IBARAKI 300-0847 JAPAN

電話番号:

0298-41-2001

ファクシミリ番号:

0298-41-2009

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名:代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第 III 欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

矢野 実

YANO Minoru

〒396-0002 日本国長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1063-103

株式会社医学生物学研究所内

c/o MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

1063-103 Aza Ohara, Oaza Terasawaoka, Ina-shi, NAGANO

396-0002 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

玉井 克之

TAMAI Katsuyuki

〒396-0002 日本国長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1063-103

株式会社医学生物学研究所内

c/o MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

1063-103 Aza Ohara, Oaza Terasawaoka, Ina-shi, NAGANO

396-0002 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

第Ⅴ欄 国の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う（該当する□にレ印を付すこと：少なくとも1つの□にレ印を付すこと）。

広域域中半管

- ☐ AP ARIPO半管管：GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SL シェラ・レオネ Sierra Leone, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ EA ユーラシア半管管：AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ EP ヨーロッパ半管管：AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ OA OAPI半管管：BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

国内半管管（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> LR リベリア Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia |
| <input type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| | <input type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway |
| <input type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input type="checkbox"/> CN 中国 China | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic | <input type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input type="checkbox"/> SL シェラ・レオネ Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada | <input type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | |
| <input type="checkbox"/> IN インド India | <input type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | <input type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 日本 Japan | <input type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | <input type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa |
| <input type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | <input type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |

下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定するためのものである

- ☐ _____
- ☐ _____
- ☐ _____

指定の確認の宣誓：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣誓から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定を確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣誓する。（指定の確認は、指定を付する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

第VI欄 優先権の主張

他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 30.10.98	平成10年特許願 第310422号	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				

☒ 上記()の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の()の番号のものについては、出願書類の認証様本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

(1)

*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択

先の調査結果の利用請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日、月、年）

出願番号

国名（又は広域官庁）

ISA / J P

第VIII欄 照会欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 4 枚
 明細書（配列表を除く）..... 37 枚
 請求の範囲 3 枚
 要約書 1 枚
 図面 5 枚
 明細書の配列表 88 枚
 合 計 138 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- ☒ 手数料計算用紙
- ☒ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
- ☐ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
- ☐ 別個の記名押印された委任状
- ☐ 包括委任状の写し
- ☐ 記名押印（署名）の説明書
- ☐ 優先権書類（上記第VI欄の()の番号を記載する）
- ☐ 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）
- ☐ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
- ☒ スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）
- ☒ その他（書類名を詳細に記載する）
 陳述書、フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名： 日本語

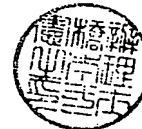
IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

弁理士 清水 初志



弁理士 橋本 一憲



受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された
国際調査機関

ISA / J P

6. ☐ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に
調査用写しを送付していない

2. 図面

☐ 受理された☐ 不足図面がある

国際調査機関記入欄

記録原本の受理の日

様式PCT/RO/101（最終用紙）（1998年7月：再版1999年7月）

3T 091830706
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference M3-007PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/05983	International filing date (<i>day/month/year</i>) 28 October 1999 (28.10.99)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 30 October 1998 (30.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/53, 9/02, 1/21, 1/19, 1/15, 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/26, 1/68, G01N 33/50, 33/15, 33/566		
Applicant MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
 These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 May 2000 (18.05.00)	Date of completion of this report 30 January 2001 (30.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05983

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05983

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/53, 9/02, 1/21, 1/19, 1/15, 5/10,
C07K16/40, C12Q1/26, 1/68,
G01N33/50, 33/15, 33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ
PIR/SWISSPROT/GENESEQ
BIOSIS/WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	J. Biol. Chem., 274(35), August 27 1999 Qui-AnSun et al., "Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase", p. 24522-24530	1-17, 19 18
P, X P, A	Eur. J. Biochem., 261(2), April 1999 Antonio Miranda-Vizuete et al., "Human mitochondrial thioredoxin reductase. cDNA cloning, expression and genomic organization", p. 405-412	1-17, 19 18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 01. 00

国際調査報告の発送日

08.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4 B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	FEBS Letters, 442(1), Jan. 8 1999 Pamela Y. et al., "Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase", p. 105-111	1-17, 19 18
P, X P, A	Database Medline on PubMed, US National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), No. 10462449, Gorlatov SN., et al., "Human selenium-dependent thioredoxin reductase from HeLa cells: properties of forms with differing heparin affinities", abstract, Arch. Biochem. Biophys, 369(1), p. 133-142, Sep. 1 1999	1-17, 19 18
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93(3), Feb. 6 1996 Takashi Tamura et al., "A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity" p. 1006-1011	1-19
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(12), June 11 1996 Vadim N. Gladyshev et al., "Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene" p. 6146-6151	1-19
A	FEBS Letters, 373(1), Oct. 2 1995 Pamela Y. Gasdaska et al., "Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase" p. 5-9	1-19
A	J. Biol. Chem, 273(15), Apr. 10 1998 Liangwei Zhong et al., "Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue" p. 8581-8591	1-19
A	GENOMICS, 37(2), Oct. 15, 1996 John R. Gasdaska et al., "Human thioredoxin reductase gene localization to chromosomal position 12q23-q24.1 and mRNA distribution in human tissue", p. 257-259	1-19

EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 M3-007PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/05983	国際出願日 (日.月.年) 28.10.99	優先日 (日.月.年) 30.10.98
出願人(氏名又は名称) 株式会社医学生物学研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/53, 9/02, 1/21, 1/19, 1/15, 5/10,
C07K16/40, C12Q1/26, 1/68,
G01N33/50, 33/15, 33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ
PIR/SWISSPROT/GENESEQ
BIOSIS/WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	J. Biol. Chem, 274(35), August 27 1999 Qui-AnSun et al., "Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase", p. 24522-24530	1-17, 19 18
P, X P, A	Eur. J. Biochem., 261(2), April 1999 Antonio Miranda-Vizuetete et al., "Human mitochondrial thioredoxin reductase. cDNA cloning, expression and genomic organization", p. 405-412	1-17, 19 18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 01. 00

国際調査報告の発送日

08.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生



4 B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	FEBS Letters, 442(1), Jan. 8 1999 Pamela Y. et al., "Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase", p. 105-111	1-17, 19 18
P, X P, A	Database Medline on PubMed, US National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), No. 10462449, Gorlatov SN., et al., "Human selenium-dependent thioredoxin reductase from HeLa cells: properties of forms with differing heparin affinities", abstract, Arch. Biochem. Biophys, 369(1), p. 133-142, Sep. 1 1999	1-17, 19 18
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93(3), Feb. 6 1996 Takashi Tamura et al., "A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity" p. 1006-1011	1-19
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(12), June 11 1996 Vadim N. Gladyshev et al., "Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene" p. 6146-6151	1-19
A	FEBS Letters, 373(1), Oct. 2 1995 Pamela Y. Gasdaska et al., "Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase" p. 5-9	1-19
A	J. Biol. Chem, 273(15), Apr. 10 1998 Liangwei Zhong et al., "Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue" p. 8581-8591	1-19
A	GENOMICS, 37(2), Oct. 15, 1996 John R. Gasdaska et al., "Human thioredoxin reductase gene localization to chromosomal position 12q23-q24.1 and mRNA distribution in human tissue", p. 257-259	1-19



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒 300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1
関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）
〔PCT規則71.1〕

発送日

（日.月.年）

13.02.01

出願人又は代理人
の書類記号

M3-007PCT

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP99/05983

国際出願日

（日.月.年） 28.10.99

優先日

（日.月.年） 30.10.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社医学生物学研究所

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）

特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 M3-007PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/05983	国際出願日 (日.月.年) 28.10.99	優先日 (日.月.年) 30.10.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C12N15/53, 9/02, 1/21, 1/19, 1/15, 5/10, C07K16/40, C12Q1/26, 1/68, G01N33/50, 33/15, 33/566		
出願人(氏名又は名称) 株式会社医学生物学研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.05.00	国際予備審査報告を作成した日 30.01.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子	4 B 9838 印
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-19	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-19	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-19	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-19

上記請求の範囲に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献に対して進歩性を有する。

文献1: FEBS Letters, 373(1), Oct. 2 1995

Pamela Y. Gasdaska et al., "Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase", p. 5-9

には、ヒトチオレドキシンレダクターゼIのアミノ酸及びDNA配列が記載されているが、ヒトチオレドキシンレダクターゼIIとの相同性は高くなく、X I A P結合活性を有しない。

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

PCT/JP99/05983

PE402

P C T

00.5.31

受付

国際予備審査請求書の の受理通知書

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、
実施細則601(a)〕

発送日（日．月．年）

30.05.00

出願人又は代理人

の書類記号

M3-007PCT

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/05983

国際出願日（日．月．年）

28.10.99

優先日（日．月．年）

30.10.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社医学生物学研究所

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

18日05月00年

2. この受理の日は次に示す日である。

☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則61.1(b)）

☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則59.3(e)）

☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）
詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/IPEA/402（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

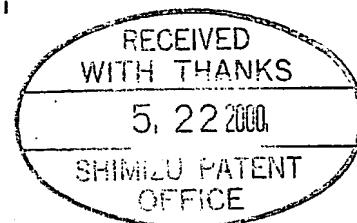
NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Building 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi
Ibaraki 300-0847
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 11 May 2000 (11.05.00)		
Applicant's or agent's file reference M3-007PCT		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP99/05983	International filing date (day/month/year) 28 October 1999 (28.10.99)	
		Priority date (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)
Applicant MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
JP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
EP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 11 May 2000 (11.05.00) under No. WO 00/26382

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---



特許協力条約に基づく国際出願 国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。



国際予備審査機関の確認		国際予備審査機関記入欄	
請求書の受理の日		出願人又は代理人の書類記号 M3-007PCT	
第 I 欄 国際出願番号	第 II 欄 国際出願日 (日. 月. 年)	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年)	
PCT/J P 99/05983	28.10.99	30.10.98	
発明の名称 チオレドキシンレダクターゼ II.			
第 II 欄 出願人			
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)		電話番号:	
株式会社医学生物学研究所 MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. 〒460-0002 日本国愛知県名古屋市中区丸の内 3 丁目 5-10 住友商事丸の内ビル 5 階 Sumitomo-shoji, Marunouchi Bldg. 5F, 5-10, Marunouchi 3-chome, Naka-ku, Nagoya-shi, AICHI 460-0002 JAPAN		ファクシミリ番号:	
		加入電信番号:	
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)			
田路 真悟 TOJI Shingo 〒396-0002 日本国長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1063-103 株式会社医学生物学研究所内 c/o MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. 1063-103, Aza Ohara, Oaza Terasawaoka, Ina-shi, NAGANO 396-0002 JAPAN			
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)			
矢野 実 YANO Minoru 〒396-0002 日本国長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1063-103 株式会社医学生物学研究所内 c/o MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. 1063-103, Aza Ohara, Oaza Terasawaoka, Ina-shi, NAGANO 396-0002 JAPAN			
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
<input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人が表裏に記載されている。			

PCT/JP99/05983

第II欄の続き 出願人

この第II欄の続きを使用しないときは、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

玉井 克之

TAMAI Katsuyuki

〒396-0002 日本国長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063-103

株式会社医学生物学研究所内

c/o MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

1063-103, Aza Ohara, Oaza Terasawaoka, Ina-shi, NAGANO

396-0002 JAPAN

国籍(国名): 日本国JAPAN

住所(国名): 日本国JAPAN

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍(国名):

住所(国名):

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍(国名):

住所(国名):

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍(国名):

住所(国名):

☐ その他の出願人が他の続葉に記載されている。

第III欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

電話番号：

0298-41-2001

ファクシミリ番号：

0298-41-2009

加入電話番号：

10297 弁理士 清水 初志 SHIMIZU Hatsushi
10877 弁理士 橋本 一憲 HASHIMOTO Kazunori
〒300-0847 日本国茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
Kantetsu Tsukuba Bldg.6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi,
IBARAKI 300-0847 JAPAN

☐ 通知のためのあて名：代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第IV欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☐ 明細書に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 請求の範囲に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正(添付した説明書も含む)を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲について行った補正を無視し、かつ、取り消されたものとみなして開始することを希望する。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過後まで延期されることを希望する(ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く(規則69.1(d))。この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。)

*記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予備審査機関が補正(原本又は写し)を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2)国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正(原本又は写し)を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は、日本語であり、

☒ 国際出願の提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第V欄 国の選択

出願人は、選定資格のある全ての指定国(即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第Ⅱ章に拘束されている国)を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。：

第VI欄 附合材料

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する書類による書類が添付されている。

国際予備審査機関書記入欄

- | | | | |
|--|---|--------------------------|--------------------------|
| 1. 国際出願の翻訳文 | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書 | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. 書簡 | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. その他 (書類名を具体的に記載する) : | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

受 領

未 受 領

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

- | | |
|---|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 | 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を
貼付した書面 | 4. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) に関する説明書 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込を証明する書面 | 5. <input type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表
(フレキシブルディスク) |
| 2. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 6. <input type="checkbox"/> その他 (書類名を具体的に記載する) : |

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

弁理士 清水 初志



弁理士 橋本 一憲



国際予備審査機関書記入欄

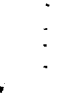
1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則 60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。 ☐ 出願人に通知した。4. ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局書記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

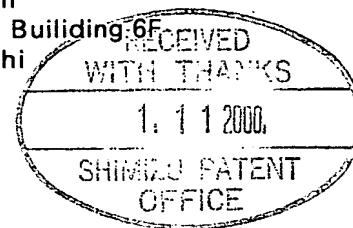
NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Building 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi
Ibaraki 300-0847
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 28 December 1999 (28.12.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference M3-007PCT	International filing date (day/month/year) 28 October 1999 (28.10.99)
International application No. PCT/JP99/05983	Priority date (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Applicant MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. et al

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
30 Octo 1998 (30.10.98)	10/310422	JP	20 Dece 1999 (20.12.99)

<p style="text-align: center;">The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;">Tessadel PAMPLIEGA <i>tdp</i></p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

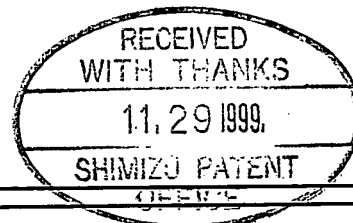
NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Building 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi
Ibaraki 300-0847
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 16 November 1999 (16.11.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference M3-007PCT	International application No. PCT/JP99/05983

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. (for all designated States except
US)

TOJI, Shingo et al (for US)

International filing date : 28 October 1999 (28.10.99)
Priority date(s) claimed : 30 October 1998 (30.10.98)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 12 November 1999 (12.11.99)
List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : JP, US

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: Y. KUWAHARA Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

清水 初志

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所



殿

P C T

国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP99/05983

RO105

発送日（日、月、年）

09.11.99

出願人又は代理人

の書類記号

M3-007PCT

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/05983

国際出願日（日、月、年）

28.10.99

優先日（日、月、年）

30.10.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社医学生物学研究所

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、09日11月99年に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

PCT/JP99/05983

SA202

P C T

調査用写しの受理通知書

（法施行規則第39条）
〔PCT規則25.1〕

発送日（日．月．年）

09.11.99

出願人又は代理人

の書類記号

M3-007PCT

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/05983

国際出願日（日．月．年）

28.10.99

優先日（日．月．年）

30.10.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社医学生物学研究所

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日に受理したので通知する。

国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日に受理したので通知する。

09 日 11 月 99 年（受理の日）

2. ☒ 調査用写しには、コンピューター読取りが可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が添付されている。
3. 国際調査報告の作成期間
国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。
4. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/ISA/202（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協定条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C12N 15/53, 9/02, 1/21, 1/19, 1/15, 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/26, 1/68, G01N 33/50, 33/15, 33/566	A1	(11) 国際公開番号 WO00/26382 (43) 国際公開日 2000年5月11日(11.05.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05983 (22) 国際出願日 1999年10月28日(28.10.99) (30) 優先権データ 特願平10/310422 1998年10月30日(30.10.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 医学生物学研究所 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP] 〒460-0002 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5-10 住友商事丸の内ビル5階 Aichi, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 田路真悟(TOJI, Shingo)[JP/JP] 矢野 実(YANO, Minoru)[JP/JP] 玉井克之(TAMAI, Katsuyuki)[JP/JP] 〒396-0002 長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063-103 株式会社 医学生物学研究所内 Nagano, (JP)		(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP) (81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: THIOREDOXIN REDUCTASE II (54) 発明の名称 チオレドキシンレダクターゼ II (57) Abstract A XIAP-binding protein and cDNA encoding the same. This protein having a thioredoxin reductase activity is named thioredoxin reductase II (TxRII). It is also clarified that TxRII has subfamilies TxRII α and TxRII β by alternative splicing.		

(57)要約

XIAP結合タンパク質、ならびにそれをコードするcDNAが提供された。チオレドキシンレダクターゼ活性を持つこのタンパク質を、チオレドキシンレダクターゼ II(TxRII)と名づけた。更にTxRIIにはオルターネイティブスプライシングによるサブファミリーTxRII α 、ならびにTxRII β が存在することを明らかにした。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BH	バーレーン	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BM	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BN	ベラルーシ	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
CC	中央アフリカ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CF	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IN	インド	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明細書

チオレドキシンレダクターゼ I I

技術分野

本発明は、チオレドキシンレダクターゼ活性を持つ新規なタンパク質をコードする遺伝子、ならびにこのタンパク質そのものに関するものである。このタンパク質は、アポトーシス、がん化、あるいは炎症等のシステムに密接に関連している可能性が高く、治療薬や診断マーカーの研究材料として幅広い応用が期待される物質である。

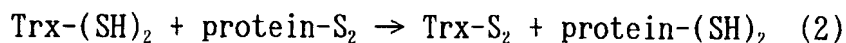
背景技術

ウイルスの感染があったとき、宿主側の細胞がアポトーシスを起こす現象が知られている。この現象は、感染細胞を生体から排除しようとする防御機構のひとつと考えられている。これに対してウイルス側は、自身が増殖するための時間を稼ぐためにアポトーシスの抑制システムを備えている。すなわち、ウイルスが産生するアポトーシス阻害タンパク質(Inhibitor of Apoptosis protein:IAP)は、宿主のアポトーシスを阻害する抗アポトーシスタンパク質のひとつである。その後、IAPはウイルスだけでなく高等動物においてもそのホモログの存在が確認された。ヒトのIAPホモログは、これまでにHIAP 1、HIAP 2、およびXIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)が報告されている。そのうちHIAP 1とHIAP 2は、TRAF2 (TNFR associated factor 2)と結合することが明らかにされた(Cell 83(7): 1243-52, 1995.; Proc Natl Acad Sci U S A 94(19): 10057-62, 1997)。一方 XIAPに結合する因子は同定されていない。ヒトにおけるアポトーシスの制御機構に關与するXIAPの機能解析を進めるには、その結合因子を同定する必要がある。

一方、チオレドキシンレダクターゼ（以下、TxRと省略する）については次のよ

うなことが明らかになっている。すなわち、チオレドキシンの生成を通じたDNA転写機構への関与と、がんの増殖への関与である。これまでに報告されている、知見を以下にまとめる。

チオレドキシンレダクターゼ ;TxR(EC 1.6.4.5)はピリジンヌクレオチドジスルフィドオキシドレダクターゼ ファミリーの1つである。このファミリーには、グルタチオンレダクターゼ、リボアミド デヒドロゲナーゼ、トリパノチオン レダクターゼ、水銀イオン レダクターゼやNADPH ヘルオキシダーゼが含まれる。これらのタンパク質は2量体を形成し、ジスルフィド結合をレドックス活性中心に持つ。フラビンアデニンジヌクレオチド(以下、FADと省略する)を補酵素とし、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸(以下NADPHと省略する)を利用し基質を還元する。チオレドキシンレダクターゼはNADPHをNADP⁺に酸化し、同時に基質である酸化型チオレドキシン(-S₂)を還元型チオレドキシン(-SH)₂に変換する(1)。還元型チオレドキシンはタンパク質のジスルフィド(S-S)結合を還元し、自身は酸化型チオレドキシンになる(2)。なお、以下チオレドキシンはTrxと省略する。



Trxはレドックスタンパク質であり、生体内で還元状態を作り出す電子供与体として重要な作用を担っている。例えば、リボヌクレオチドレダクターゼ、メチオニンスルホキシドレダクターゼ(Annu.Rev.Biochem 54: 237-71. 1985.)、ビタミンKエポキシドレダクターゼ(Biochem.Biophys.Res.Comm.,155(3):1248-54.1988.)などの酵素の電子供与体である。またタンパク質のホールディングを触媒し、転写因子のDNA結合能を決定している。TrxによってDNA結合能が制御されている転写因子には、以下のような物質が知られている。

NF- κ B (J.Biol.Chem. 268(15): 11380-8. 1993.) (Nucleic Acids Res. 20(15): 3821-30.1992.)、

TFIIIC、

BZLF1(Oncogene 6(7): 1243-50. 1991.)

グルココルチコイド、

p53

また転写因子AP-1はRef-1によって還元されDNA結合能を有するが、このRef-1はTrxを介して還元される。

一方、TxRは、抗がん剤のターゲットとしても注目されている。たとえば分泌型Trxはサイトカイン様の作用を持つことが報告されており、特に還元型Trxは細胞増殖に必須であることが報告されている。この還元型Trxを生成するのがTxRである。興味深いことに、ある種の癌ではTrxの血中濃度が上昇している事が報告されており、TxRの蛋白量も増加していると報告されている。Trxのレドックス活性中心に変異を挿入し、癌細胞に過剰発現させたところ癌細胞の増殖がほぼ完全に抑制されたとの報告もある。このような背景から、癌細胞の増殖を停止させるために、TxRに対する阻害剤のスクリーニングが最近活発に行われている。抗癌剤であるキノンやニトロソウレア、細胞増殖を停止し、分化誘導促進剤であるレチノイン酸は、TxRを阻害する作用を合わせ持つ。

さて、TxRは、必須微量元素の一つであるSe（セレン）をSecys（セレノシステイン）として含有するタンパク質である。興味深いことにSecysは翻訳されうる21番目のアミノ酸で、終止コドンUGAによってコードされるというユニークな生合成機構を持っている。Secysは放射線防御作用や、抗癌作用を有することも報告されている。Secys含有タンパク質としてこれまでに、活性酸素種ヒドロペルオキシド（ H_2O_2 ）をグルタチオンやTrx依存的に還元消去するグルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）、甲状腺ホルモン（チロキシン）前駆体T4を活性型T3に変換するI型テトラヨードチロニン脱ヨード酵素、また機能が良くわかっていないものとして、10個のSecysを含有するセレノプロテイン Pや、筋肉中に存在する低分子量のSecys含有タンパク質セレノプロテイン Wが報告されている。すでに報告されているヒトTxR

はCys-Secys-Gly-終止コドン (UAA)というアミノ酸配列でSecysをコードすることが報告されている。最も研究が進んでいる牛のTxRをカルボキシペプチダーゼYで処理し、C-末端のSecysを除去したところ、活性がなくなったことから、このC-末端のSecysは活性に必須である事が報告されている(Zhong, L., E. S. Arn-er, et al. (1998). Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. J Biol Chem 273(15): 8581-91.)。新しいセレノタンパク質の構造が明らかにされれば、セレノタンパク質の研究に貢献するものと思われる。

発明の開示

本発明は、XIAP結合タンパク質とこれをコードするDNAの単離を課題としている。更に本発明は、新規なヒトに由来するTxR活性を有するタンパク質と、それをコードするDNAの単離を課題としている。

本発明者らは、酵母2ハイブリッド法(yeast two hybrid system)を用いてXIAP結合蛋白質の探索を行った。その結果、ヒト胎盤cDNAライブラリーの中からXIAP結合蛋白質をコードする遺伝子の単離に成功した。そして、この遺伝子によってコードされるタンパク質がTxR活性を持つことを見出し、本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のタンパク質、これをコードするDNA、およびそれらの製造方法と用途に関する。

- (1) 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (2) 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および/または挿入したアミノ酸配列からなり、配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して60%以上のホモロジーを持つチオレドキシ

ンレダクターゼ活性を有するタンパク質。

- (3) 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、チオレドキシンレダクターゼ活性を有するタンパク質。
- (4) 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、XIAP結合活性を有するタンパク質。
- (5) 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、XIAP結合活性を有するタンパク質。
- (6) (1) - (5)のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。
- (7) (1) - (5)のいずれかに記載のタンパク質をコードするcDNA。
- (8) 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基酸配列のタンパク質コード領域からなるcDNA。
- (9) (7)または(8)に記載のDNAが挿入されたベクター。
- (10) (9)に記載のベクターを保持する形質転換体。
- (11) (10)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1) - (5)のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。
- (12) (7)に記載のcDNA若しくはその一部に対するアンチセンスDNA。
- (13) (7)に記載のcDNAにハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つオリゴヌクレオチド。
- (14) 以下に示す第1エクソンまたは第2エクソン、および第3 - 第19エクソンを含み、チオレドキシンレダクターゼ活性を持つタンパク質をコードするDNA。

第1エクソン：配列番号：18

第2エクソン：配列番号：19

第3エキソン：配列番号：20

第4エキソン：配列番号：21

第5エキソン：配列番号：22

第6エキソン：配列番号：23

第7エキソン：配列番号：24

第8エキソン：配列番号：25

第9エキソン：配列番号：26

第10エキソン：配列番号：27

第11エキソン：配列番号：28

第12エキソン：配列番号：29

第13エキソン：配列番号：30

第14エキソン：配列番号：31

第15エキソン：配列番号：32

第16エキソン：配列番号：33

第17エキソン：配列番号：34

第18エキソン：配列番号：35

第19エキソン：配列番号：36

- (15) 配列番号：37で示される(14)に記載のDNA。
- (16) 配列番号：18ー配列番号：36のいずれかに記載の塩基配列またはその部分配列にハイブリダイズするDNAであって、ヒト染色体22q11.2にハイブリダイズしうるDNA。
- (17) 配列番号：37に記載の塩基配列のうち、配列番号：18ー配列番号：36に記載された塩基配列を除く部分、またはその一部とハイブリダイズしうるDNA。
- (18) 下記の工程を含む、XIAPとその結合因子との結合を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを、請求項2に記載のタンパク質と同時に接触させるか、または

(a)' スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを接触後に、請求項2に記載のタンパク質を更に接触させ、

(b) XIAPに結合したおよび／またはしなかった請求項2に記載のタンパク質の量を決定し、

(c) XIAPと請求項2に記載のタンパク質との結合を抑制する化合物を選択する

(19) 下記の工程を含む、チオレドキシンレダクターゼIIの酵素活性を促進、または抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質を請求項1-3に記載のタンパク質と接触させる工程、

(b) 請求項1-3に記載のタンパク質のチオレドキシンレダクターゼ活性の変化を観察する工程、および

(c) チオレドキシンレダクターゼIIの酵素活性を促進、または抑制する化合物を選択する工程

本発明者らが得た新規なタンパク質TxRII α およびTxRII β のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：2および配列番号：4に、そしてそれをコードするcDNAの塩基配列を配列番号：1および配列番号：3にそれぞれ示した。なお、以降本明細書においてはTxRII α とTxRII β の両方を同時に含む用語としてTxRIIsを用いることとする。このアミノ酸配列は、ヒト胎盤のcDNAライブラリーをもとに、2ハイブリッド法を応用してスクリーニングし、構造決定した新規な遺伝子に基づいて推定した配列である。2ハイブリッド法は、タンパク質の相互作用を高い感度で確認するための方法である。その原理については実施例中で触れるように、マーカー遺伝子の発現を指標に、相互作用するタンパク質の組み合わせをスクリーニングする方法である。本発明者らは、XIAPに対する結合活性を持った物質の探索にこの方法を応用し

て新規な因子を発見し、その構造を明らかにした。

本発明によって提供されるTxRIIsをコードする遺伝子の染色体上の位置は、22q11.2であることが確認された。TxRIIsはいずれもこの領域の70kbpの中に19のエキソンに分かれて存在していた。染色体上へのマッピングはデータベースの検索によって行ったが、染色体のこの位置に、TxR活性を持ったタンパク質の遺伝子が存在していることはまったく知られていなかった。TxRII α とTxRII β とは、2番目のエキソン以降はまったく同じ構造を持つことから、TxRIIのオルターネイティブスプライシングフォームであると断定した。すなわち、TxRII α の1番目のエキソンが下記の第1エキソン（配列番号：18）となっており、TxRII β の1番目のエキソンは第2エキソン（配列番号：19）となっている。両者の2番目のエキソン以降は、第3エキソン（配列番号：20）－第19エキソン（配列番号：36）で共通である。

興味深いことにこのTxRII遺伝子の近傍には、Di George症候群や神経線維腫症などの原因遺伝子がマップされており我々の発見したTxRIIsも何らかの遺伝病に関与している可能性を否定できない。更に注目すべきことにTxRII α のエキソン1は、カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ（EC 2.1.1.6、以下COMTと省略する）のプロモーター領域に重なっていた。またCOMTも染色体上22q11.1→11.2マップされており、その転写方向はTxRIIに対して逆向きであった。つまりTxRII α が転写された場合、COMTのmRNAに対してアンチセンスに作用して、COMTの発現を阻害する可能性が示唆された。これが精神分裂症やパーキンソン病の原因である可能性もある。またこの事実から、TxRII α のエキソン1のセンス鎖DNAを過剰発現させることによって、あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドを、またはセンスの核酸アナログを投与することで、効率的にCOMTの転写を阻害できると考えられる。

本発明によって提供されるゲノムDNAにおけるエクソンとイントロンの位置に関する情報は、これらの疾患と遺伝子異常との関連性について研究を進める上で不可欠である。またこれらの遺伝子異常を診断するためのプローブの提供を可能とする

ものでもある。ゲノム上に占める、各エキソンの位置について表 1 に示す。なお、以下に示す位置を示す番号は配列番号：37 に示したゲノムの塩基配列における5' 末端を 1 としたときの番号である。更にこれらの情報に基づいて、たとえば各エキソンに特異的にハイブリダイズする DNA は、イントロン部分の増幅のためのプライマーとして利用することができる。逆に配列番号：37 に記載した塩基配列のうち、各エキソンを除いたイントロン領域にハイブリダイズする DNA は、PCR によるエキソンの増幅に利用される。このようなプライマーは、イントロンやエキソンの異常を知るために不可欠なツールである。遺伝子疾患にはタンパク質をコードする領域の異常のみならず、イントロンの異常によってスプライシングが正しく行えないことが原因となっているケースも存在することから、このようなプライマーは遺伝子疾患の解明に有用である。更に、エキソンにハイブリダイズすることができる DNA はプローブとして有用である。特にこれらの DNA の中で染色体 22q11.2 に特異的にハイブリダイズする DNA は、配列番号：37 に示す本発明によるゲノム DNA のクローニングのためのプローブとして有用である。すなわち、ヒトのジェノミックライブラリーをソースとしてこれらのプローブでスクリーニングを行えば、配列番号：37 に示すゲノム DNA の単離が可能である。プローブやプライマーとして利用する場合、本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイズを達成するために少なくとも 15 ヌクレオチドから構成され、望ましくは 15-200 ヌクレオチド、より望ましい条件としては 25-100 ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドとする。

表 1

		スプライシング部位の構造		配列番号
エキソン	塩基番号	3' 側	5' 側	
Exon 1	1- 103	agcag/GTA		18

Exon 2	9247- 9446	ccaag/GTG	CAG/caggtc	1 9
Exon 3	10706-10774	ggagg/GTA	CAG/ccgccc	2 0
Exon 4	22205-22261	ccaag/GTA	CAG/gcacc	2 1
Exon 5	22800-22944	gactg/GTA	CAG/gagga	2 2
Exon 6	23587-23661	gacag/GTA	CAG/aaaag	2 3
Exon 7	25961-26039	aagag/GTG	CAG/attct	2 4
Exon 8	26529-26591	cgcac/GTG	CAG/atcga	2 5
Exon 9	30358-30428	aaaac/GTA	CAG/gttgg	2 6
Exon 10	43016-43035	cagct/GTA	CAG/atgtg	2 7
Exon 11	43954-44045	accag/GTA	CAG/caaat	2 8
Exon 12	46503-46677	catag/GTA	CAG/gtcga	2 9
Exon 13	58623-58759	tggag/GTA	AAG/gggcg	3 0
Exon 14	61367-61462	acaat/GTG	CAG/gttct	3 1
Exon 15	61813-61905	ttgag/GTG	CAG/gtcta	3 2
Exon 16	63647-63718	taaag/GTG	CAG/atggt	3 3
Exon 17	63897-63994	atcaa/GTA	CAG/gtgtg	3 4
Exon 18	64850-65044	cccag/GTA	CAG/gatgg	3 5
Exon 19	66277-66566	-		3 6

配列番号：2で示されるアミノ酸配列は、データベース検索によると公知のヒトTxRに対して55%の相同性を示した。またヒトグルタチオンレダクターゼに対しては38%の相同性を示した。特に、レドックス活性中心、FAD結合領域、NADPH結合領域、セレノシステイン活性中心においては完全に相同に保存されていた。本発明によるTxRII α と、公知のTxRとのアミノ酸配列のアライメントを図1に示した。これらのデータに基づいて本発明者らは配列番号：2のアミノ酸配列を持つタンパク質をTxRII α と名づけた。しかし公知のヒトTxRにはXIAPとの結合活性が見られないこと

から、本発明の蛋白質は新規である。またアミノ酸配列においても、両者のホモロジーは60%に満たない。したがって、両者は明らかに異なった蛋白質であり、ヒトTxRが本発明によるTxRII α やTxRII β の構造や機能を予測させるものではない。

1995年に報告されたヒト チオレドキシンレダクターゼは3'側に存在する非翻訳領域（以下3' UTRと省略する）にAUUUAという配列を含むことが報告されている。このAUUUAは、mRNAの不安定性に寄与していると考えられ、この配列を3' UTRに含むことでmRNAが素早く分解されることが報告されている。このような配列は、サイトカインやプロトオンコジーンにおいても報告されており、そしてこれらのタンパク質が刺激により瞬時に増加し、消失することは周知のことである。これらの事実から推察すると、先に報告されたヒト チオレドキシンレダクターゼは、ある何らかの刺激によって一時的に転写翻訳され、その後速やかに分解され、その作用はごく一時的なものに限られると考えられる。それに対し、本発明のTxRIIsの3' UTRにはこのような配列が存在せず、どちらかといえばTxRIIsが恒常的に生体内のレドックス制御に関与していると考えられる。従ってTxRIIsの阻害剤や促進剤は、これまでに報告されているTxRに対する阻害剤とは、特異性、阻害効果、治療薬として全く異なるものとなる可能性が大きいと考えられる。したがって、本発明によって明らかにされたTxRIIsに関する知見は、生体内のレドックス制御に関与する薬剤の開発において大きな意味を持つものである。

本発明によるタンパク質は、配列番号：2や配列番号：4に明らかにされたもののみならず、同等の生理活性を持つ変異体をも含むものである。すなわち本発明は、配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなりXIAP結合活性を有するタンパク質すべてを含む。あるいはまた、配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／また

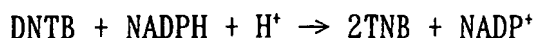
は挿入したアミノ酸配列からなり、しかも望ましくは全体として前記アミノ酸配列に対して60%以上のホモロジーを備え、TxR活性を有するタンパク質すべてを含む。

配列番号：2 または配列番号：4 として記載したアミノ酸配列からわかるように、本発明によるTxRIIsはセレノシステインを分子内に含むセレノ蛋白質である。一方、既に報告されているヒトTxRはCys-Secys-Gly-終止コドン (UAA) というアミノ酸配列でSecysをコードすることが報告されている。しかも、ウシTxRではこのC末端のCys-Secys-Gly という配列がTxRの活性発現に必要な領域とされている。したがって本発明によるヒトTxRIIsにおいても、TxRの活性発現にこの領域が重要な意味を持つことが推測される。

生理活性を維持しながらアミノ酸配列に変異を加える方法は公知である。たとえば、ランダム突然変異を用いて変異体を作製する方法としてchemical mutagenesis法(Myers RM, et al. Methods Enzymol., 1987;155:501-527)が知られている。この方法では、まず注目している遺伝子の1本鎖DNAに塩基修飾試薬を加えてランダムに変異を導入する。次いで得られた1本鎖DNAを鋳型として、PCRにより適当なプライマーを使って2本鎖DNAを合成しクローニングする。変異体のライブラリーから所望の活性を持った発現産物を与えるクローンを選択すれば、目的とする変異体を得ることができる。他方、標的塩基を決めて変異体を作成する方法としては、突然変異オリゴヌクレオチドプライマーを使って、注目している遺伝子を鋳型にPCRを行うことで変異を導入する方法(Ito W, et al, Gene 1991 Jun 15;102(1):67-70)も公知である。なおアミノ酸配列の変異は人工的な操作のみならず、自然な状態でも生じることがある。本発明における変異体とは、TxR活性、あるいはXIAP結合活性を維持している限り、このような自然に生じた変異体も含むものである。

TxR活性を確認する方法としては、たとえば次の2つの方法が知られている(Holmgren, A. et al. Methods Enzymol. 252:199)。まず、5,5'-ジチオビス(2-ニトロベンゾイックアシッド)[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid;DTNB)のような適当なSH指示薬を用い、TxR活性によって生じる5-メルカプト-2-ニトロベンゾイックア

シッド(5-mercapto-2-nitrobenzoic acid;TNB)を412nmのチオール吸収で測定する方法が公知である。この反応は以下のように示される。



TxR活性のもう一つの指標は、TxR活性によって生じた還元型TrxがインシュリンのSS結合を切断するので、このときに生じる変化を追跡して酵素活性を知る、いわゆるインシュリンアッセイと呼ばれる手法である。指標となる変化には、補酵素NADPHの酸化による340nmの吸収の減少や、インシュリンの還元に伴って生じるチオール基の412nmにおける吸収が利用される。TxRによる還元型Trxの生成過程については既に述べたとおりである。

一方、XIAP結合活性については、配列番号：2または配列番号：4に記載したアミノ酸配列を持つ天然型のTxRII α あるいは β を基準として、その結合活性と機能的に同等なものであれば良い。機能的に同等な物質のスクリーニング方法として、具体的にはたとえば以下のような方法を示すことができる。すなわち、XIAPとその結合物質との結合を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、次の工程(a)または(a)'、および(b)を含む方法である。

(a)スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを、本発明のタンパク質と同時に接触させるか、または

(a)'スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを接触後に、本発明のタンパク質を更に接触させ、

(b)XIAPに結合したおよび／またはしなかった本発明のタンパク質の量を決定し、

(c)XIAPと本発明のタンパク質との結合を抑制する化合物を選択する

より具体的には、実施例7-5)阻害剤アッセイとして示した方法に準じた方法を示すことができる。候補化合物の希釈系列を試料とし、希釈系列依存的に吸光度の低下が観察されれば、その候補化合物には結合阻害活性があると判断される。あるいはまた、コンビナトリアルケミストリー(combinatorial chemistry)を応用することもできる。すなわち、候補化合物のライブラリーを用意し、これに本発明のタ

ンパク質をXIAPとともに加えて、候補化合物に結合するXIAPを追跡すれば、TxRIIsの拮抗阻害物質をスクリーニングすることができる。逆に、候補化合物に結合するTxRIIsを指標とすれば、TxRIIsのXIAPに対する結合をブロックする化合物をスクリーニングすることになる。

本発明によるスクリーニング方法において、前記本発明のタンパク質とは、XIAPとの結合活性ドメインを持つものであれば良い。すなわち、必ずしも配列番号：2や配列番号：4に示すアミノ酸配列を持った完全な分子でなくても良い。候補化合物や本発明のタンパク質の結合を観察するためには、これらのタンパク質を観察可能な分子で修飾しておく。観察可能な分子としては、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、および酵素活性物質等を挙げられる。前記コンビナトリアルケミストリーを応用した場合には、候補化合物のライブラリーを固相上に固着した状態にしておく、反応液の分離と洗浄に続く標識の測定までの操作を容易に行えるので便利である。

なおこれらの方法は、本発明における変異体のスクリーニングに有用なばかりでなく、XIAPと本発明のタンパク質との結合を阻害する化合物の一般的なスクリーニング方法として利用することができる。このスクリーニング方法を通じてスクリーニングされた化合物は、XIAPが関与するシグナル伝達系を制御しうることから、本発明によって提供されるタンパク質、その抗体、類似物質などには、アポトーシス促進を通じてがんの抑制やウイルス感染細胞における細胞死の誘導等の効果が期待できる。

加えて、本発明のTxRIIsを利用し、その酵素活性を促進、または抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法が提供される。この方法は、以下の工程によって構成される。

- (a) スクリーニングの対象となる候補物質をTxRIIsと接触させる工程、
- (b) TxRIIsのTxR活性の変化を観察する工程
- (c) TxRIIsのTxR活性を促進、または抑制する化合物を選択する工程

このスクリーニングに用いられるTxRIIsは、必ずしも完全な分子である必要はなく、TxRIIsの酵素活性を維持する断片を利用することもできる。TxR活性の測定は、前記のような方法に基づいて行えば良い。TxRIIsの構造が公知のTxRIとは異なっていることから、一方の活性に影響する化合物が他方に作用するとは限らない。したがってTxRIIsの酵素活性に影響を与える物質をスクリーニングする方法は、TxRIIsの酵素活性に特異的な阻害剤や活性化剤を明らかにするために、あるいはTxRIIsとTxRIに同じように作用する化合物を得るために不可欠な技術である。

TxRが生体内のレドックスを制御していることから、本発明によるスクリーニング方法に基づいて得ることができるTxRIIsの阻害剤には、抗がん剤や自己免疫疾患の治療剤としての用途が期待できる。たとえば、自己免疫疾患であるリウマチの一般的な治療薬として利用されている有機金化合物は、セレノプロテイン、中でもTxRの阻害活性が高いとされている。したがって、TxRIIの阻害作用を持つ化合物には、類似の薬理活性を期待できる(Stephan Gromer et al., J. Biol. Chem. Vol. 273, No. 32, 20096-20101, 1998)。また、TxRの活性阻害を通じて薬理活性を期待するのであれば、公知のTxRのみならずTxRIIに対しても有効な化合物を選択する必要があることから、本発明によって提供されるTxRIIの活性に影響を与える化合物のスクリーニング方法は有用である。

本発明のタンパク質は、TxRII α 、あるいは β を発現している細胞から抽出・精製することによって得ることができる。細胞には、目的とするタンパク質を高度に発現しているものを選択するのが有利である。目的とするタンパク質をコードするDNAの塩基配列が与えられているので、この配列に基づくプローブを使って、標的遺伝子を高度に発現している細胞株をスクリーニングする方法は当業者が日常的に行っている。実施例に示すように、本発明によるTxRIIsは、多くの培養細胞が発現しているので、これらの培養細胞を原料とすれば良い。また、細胞培養物から種々の抽出法やタンパク質の精製法を組み合わせることで目的とするタンパク質を純化する方法も、当業者が経験的に選択することができる。具体的には、ゲルろ過、イオン

交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イムノアフィニティクロマトグラフィーなど様々な精製方法が利用できる。

こうした天然材料からの精製とは別に、遺伝子工学的な手法によって本発明によるタンパク質を得ることもできる。たとえば配列番号：1や配列番号：3に示した塩基配列を基に、その翻訳領域を適当なベクターに組み込んで発現ベクターを構築する。そして、この発現ベクターを適当な宿主にトランスフェクトすれば目的のTxRIIを組み換え体として発現させることができる。

加えて本発明は、前記本発明によるタンパク質をコードするcDNAを提供する。本発明が開示する配列番号：1または配列番号：3に示す塩基配列を持つDNAは新規である。本発明のcDNAは、たとえば配列番号：1または配列番号：3に記載した塩基配列に基づいて設計したプローブを使ってcDNAライブラリーをスクリーニングすれば、目的とする遺伝子を得ることができる。この他、配列番号：1または配列番号：3に記載した塩基配列を基にプライマーを合成し、cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行っても、本発明による遺伝子を得ることができる。プローブやプライマーの設計と調製は、本発明のcDNAの塩基配列に基づいて当業者に公知の方法で行うことができる。PCR用のプライマーにおいては、増幅しようとするセグメントの5'末端付近と、3'末端付近の配列を選択することになる。このときに各プライマーの5'側に制限酵素認識配列を付加しておくと、ベクターへの挿入に便利である。配列番号：1、あるいは配列番号：3に示した塩基配列は、いずれも約2kbpの長さを持っている。この程度の長さであれば、一組のプライマーを利用しcDNAを鋳型として1度のPCRで全領域の増幅が可能である。得られる増副産物は、電気泳動で確認することにより標的遺伝子の高感度な検出を可能とする。あるいは増副産物をベクターに組み込むことによって発現ベクターを構築することができる。実施例に用いた市販のライブラリーには、本発明によるTxRIIsの全長cDNAが含まれている。したがって、これを鋳型としてPCRを行えば本発明のcDNAを容易に得ることができる。あるいはTxRIIsを発現していることを示した各種細胞株のmRNAをもとに

RT-PCRを行うことによって、本発明のcDNAを得ることができる。

配列番号：1、または配列番号：3に記載した塩基配列に基づいて活性型のTxRIIsの発現ベクターを構築するとき、そのCDSと並んで重要な構成要素となるのが3' UTRである。3' UTRのうち、配列番号：1の1780-1909、そして配列番号：3の1883-2012に相当する部分（配列番号：5、130bp）は共通の塩基配列で構成されている。この部分が、セレノシステインを含んだ完全な形のTxRIIsとして発現させるために必要となる。mRNAにおけるこの領域に相当する部分によって構成されるステムループ構造により、通常は停止コドンであるUGAがセレノシステインに翻訳される。先に述べたとおり、セレノシステインはTxRの酵素活性に必須のアミノ酸とされている。したがって、本発明に基づく発現ベクターには、この領域を含む形でインサートを組み込む必要がある。ただし、本発明のTxRIIsにTxR活性を期待しないのであれば、この領域は必須ではない。たとえば、特定の領域のみからなるTxRIIsのドメインペプチドの発現を目的とするようなケースでは、必要なアミノ酸配列をコードする塩基配列のみを発現可能な形で組み込むことによって目的のタンパク質を得ることができる。このようにして得られるドメインペプチドには、TxRの酵素活性は期待できないが、たとえば、本発明によるTxRIIsを認識する抗体作成のための免疫原として利用することは可能である。あるいは、XIAPとの結合を担う領域を選択すれば、本発明に基づくXIAPとの結合活性を備えた変異体の作成を可能とする。

本発明によるDNAは、配列番号：1および配列番号：3に示した塩基配列そのもので構成されるもののみならず、その変異体をも含む。本発明に基づくDNAの変異体とは、次の2つに大別される。すなわち、第一に、先に述べたアミノ酸配列に変異を持つ本発明によるタンパク質のすべてについて、それをコードする塩基配列を備えたDNAは、本発明に基づくDNA変異体に他ならない。この種の変異体をより具体的に説明すれば、TxRIIsとしての活性を維持する範囲内でアミノ酸配列に変異を加えた全ての変異体をコードするDNAは、配列番号：1あるいは配列番号：3にハイ

ブリダイズすることができるかどうかとは無関係に本発明によるDNAに含まれる。通常1つのアミノ酸に対するコドンには複数の配列が対応している（縮重）ため、与えられたアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列には理論上は天文学的な数に上る種類の配列が想定できる。この理由により、本発明によるDNAの塩基配列は特定配列との相補性とは無関係に特定されなければならないのである。

第2に、配列番号：1または配列番号：3とハイブリダイズすることができ、かつTxRIIsとしての活性を維持するタンパク質をコードするDNAは、本発明によるDNAに含まれる。ストリンジেন্টな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ハイブリダイゼーションの条件としては具体的には、例えば5xSSC、ホルムアミド非存在下で25°Cの条件が挙げられる。好ましくは6xSSC、40%ホルムアミドで25°Cで行う。更に好ましくは5xSSC、50%ホルムアミドで40°Cで行う。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、例えば、2xSSC、37°Cで洗浄する。好ましくは1xSSC、55°Cで洗浄する。更に好ましくは1xSSC、60°Cで洗浄する。

変異体も含め本発明によるDNAの塩基配列は、公知の技術に基づいてさまざまな用途に利用することができる。本発明において明らかにされたcDNAの塩基配列に基づいて、この塩基配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを得ることができる。本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、ストリンジেন্টな条件下でのハイブリダイズを達成するために少なくとも15ヌクレオチドから構成され、望ましくは15-200ヌクレオチド、より望ましい条件としては25-100ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドとする。このようなオリゴヌクレオチドは、プローブやプライマーとして利用される。与えられた配列をもとに、その配列に特異的にハイブリダイズするプローブを設定することは当業者が日常的に行っていることである。特異的なハイブリダイズを達成する塩基配列は、目的とする標的塩基配列に対して必ずしも完全に相補的である必要は無い。ストリンジেন্টな条件の元で、必要な特異性を達成できれば、配列の変異は許容される。設定された塩基配列を持ったオリ

ゴヌクレオチドは化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、さまざまなフォーマットのハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。プライマーとして利用する場合には、相補鎖の合成原理に応じて複数の領域を設定することができる。たとえばPCRのためのプライマーであれば、合成の対象となるセグメントの5'側と3'側の両端を規定する領域がプライマーとして選択される。本発明によるオリゴヌクレオチドは、基本的なPCRのみならず、RNAを鋳型とするRT-PCR、増幅領域をネストさせて高感度な検出を可能とするネステッドPCR、あるいはcDNAの合成等、様々な相補鎖合成反応に応用することができる。

たとえばTxRIIsのcDNA増幅用プライマー、あるいは3' UTR増幅用のプライマーとして次の塩基配列を示すことができる。以下に示すTxRIIsのcDNA増幅用プライマーを用いれば、本発明によるTxRIIsを公知のTxRと識別することが可能で、後者のcDNAを特異的に増幅することができる。

TxRII α のforwardプライマー（配列番号：13）：

5'-ACGATGGCGGCAATGGCGGTG-3'

TxRII β のforwardプライマー（配列番号：14）：

5'-ACCATGGAGGACCAAGCAGGT-3'

TxRIIsのreverseプライマー（配列番号：15）：

5'-TTACCCTCAGCAGCCTGTCAC-3'

3' UTR増幅用forwardプライマー（配列番号：16）：

5'-GCGCCATCCCTGCAGGCCAGG-3'

3' UTR増幅用reverseプライマー（配列番号：17）：

5'-CACACTTCAGAAAAAGTACCC-3'

本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、TxRIIsの発現を抑制するアンチセンスDNAとしても利用することができる。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、複数の要因が存在する（平島および井上「新生化学実験講座2 核

酸 I V 遺伝子の複製と発現」,日本生化学会編,東京化学同人,pp.319-347,1993)。
いずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制することも可能である。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。使用されるアンチセンスDNAは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製されたDNAは、公知の方法で、発現を抑制すべき細胞へ形質転換できる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換すべき細胞が持つ内在性TxR II s遺伝子（若しくはその相同遺伝子）またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%、最も好ましくは95%の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスRNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。

本発明は、本発明に基づくタンパク質を認識する抗体を提供する。本発明の抗体は、先に述べたような方法で得たタンパク質やその断片を公知の方法によって免疫することによって調製することができる。免疫に当たってはFCAのようなアジュバントを免疫抗原と混合し、適当な免疫スケジュールで免疫動物の皮下に免疫する。免疫動物には、TxRの構造がヒトとできるだけ異なっているものを選択すると高い免疫刺激を期待できる。抗体は、免疫動物の血清から精製したポリクローナル抗体のみならず、抗体産生細胞のクローニングによって得ることができるモノクローナ

ル抗体とすることもできる。免疫動物の抗体産生細胞を回収し、クローニングを可能とする培養細胞株と融合させてモノクローナル抗体を産生する細胞株を樹立する方法は、当業者によって自明である。こうして得られる抗体は、本発明によるTxRの免疫学的な検出や、精製に利用することができる。

更に、異種動物由来のTxRIIsを認識する抗体産生細胞が持つ抗体の可変領域の遺伝子を利用し、これをヒト化することも可能である。すなわち、たとえばマウスの抗体可変領域にヒト抗体の定常領域を備えたキメラ抗体を遺伝子組み換えによって作り出すことができる。あるいは超可領域のみをヒト抗体のフレームワークに組み込んだ、いわゆるヒト化抗体(humanaized-antibody)を得る方法も公知である。これらのヒト化した抗体は、ヒトに投与しても免疫学的な反応を起こしにくいのでin vivoにおいて安全に、しかも効果的に利用することができる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明によるTxRII α と、公知のTxRとのアミノ酸配列のアライメントを示す図。

図2は、マウス抗TxRII α 抗血清を用いたウエスタンブロット法による各種培養細胞株におけるTxRIIsの検出結果を示す写真。

図3は、各種タグを融合したTxRII α 組み換え体のDTNBアッセイによって測定したTxR活性を示すグラフ。縦軸は412nmにおける吸光度を、横軸は反応時間を示す。

図4は、各種タグを融合したTxRII α 組み換え体のインシュリンアッセイによって測定したTxR活性を示すグラフ。縦軸は340nmにおける吸光度の変化量を、横軸は反応時間を示す。

図5は、TxR活性阻害剤がflag-タグ融合TxRII α タンパク質のTxR活性に及ぼす影響をDTNBアッセイによって測定した結果を示すグラフ。TxR活性阻害剤には、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(CDNB)と13-シス-レチノイン酸を用いた。縦軸は412nmにおける吸光度を、横軸は反応時間を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。

本発明において、汎用されている手法については全てJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Pressに従って行った。

1. XIAPのPCRによるクローニング

1-1) プライマー作製

ヒトのXIAP遺伝子全長を、PCR法を用いて単離するために、以下の2つのプライマーを合成した。

・5' プライマー (XIAP 2486 (32mer))

5' - GCG GGA TCC ATG ACT TTT AAC AGT TTT GAA GG -3'

*5' 端3塩基(GCG)は制限酵素処理を円滑に行なうためのもの。

5' 端4塩基目から9塩基目まで(GGATCC)は制限酵素BamH I サイト。

・3' プライマー (XIAP 2482 (32mer))

5' - GCG CTC GAG CTA CTA TAG AGT TAG ATT AAG AC -3'

*5' 端3塩基(GCG)は制限酵素処理を円滑に行なうためのもの。

5' 端4塩基目から9塩基目まで(CTCGAG)は制限酵素Xho I サイト。

1-2) PCR

ヒトT細胞由来Jurkat細胞由来のcDNAを鋳型DNAとして用い、ヒトXIAP遺伝子全長をPCR法で増幅した。PCRは、GeneAmp PCR System 2400 (PERKINELMER)を用い、下記のプログラムで行った。

a) 94°C 5min.

b) 94°C 1min.、58°C 3min.、72°C 3min.を1サイクル

c) 94°C 1min.、65°C 1min.、72°C 2min.を35サイクル

d) 72°C 10min.

1-3) pAS2-1ベクターへのPCR産物のクローニング

i) PCR産物の精製

PCR後、増幅されたDNA断片を 1 % アガロース電気泳動によって確認した。このDNA断片を制限酵素BamH I、Xho Iで処理した。制限酵素処理したDNA断片を 1 % アガロースで電気泳動後、切り出し、ガラスマトリクス法 (BIO101社、GeneClean) により精製した。

ii) ベクターの作製

pAS2-1ベクターは、CLONTECH社のMATCHMAKER Two Hybrid System (商品名) で用いられるbaitベクターで、GAL4-DNA-BD (GAL4蛋白質のDNA Binding Domain) をコードする配列の下流にマルチクローニング部位 (MCS) が存在する。なお、2 ハイブリッド法におけるbait (おとり) とは、未知の結合因子を探し出すためのプローブとして機能する既知のタンパク質を発現する側のベクターを意味する。GAL4-DNA-BDとPCR産物の翻訳フレームを合わせるため、このMCSの制限酵素 Nde IサイトをNde Iで切断後、常法により平滑末端とし、セルフライゲーションさせ2フレームずれたベクターpAS Δ NdeI(+2)を得た。これを制限酵素BamH I、Sal Iにより処理した断片を、PCR産物と同様の方法で精製した。精製したPCR産物、pAS2-1 Δ NdeIベクターの断片をライゲーションした。精製したPCR産物、pAS2-1 Δ NdeIベクターはモル比が1になるよう混和し、T4 DNA ライゲースを用い16°Cで1時間反応させた。

iii) 大腸菌のトランスフォーメーション

常法(Hanahan, D.1983 Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, J. Mol. Biol 166 : 557)によりコンピテント化された大腸菌株DH5 α に、ライゲーション反応液を加え、穏やかに混和し氷上に30分静置後、42°C温水中で 90 秒熱ショックを加え、再度氷上に2分静置し、SOC培地を加え37°Cで1時間震盪培養した。、50 μ g/mlのアンピシリンを含むLBプレートにスプレッドし、37°Cで一晩培養した。

iv) アルカリ-SDS法によるDNAの回収およびインサートの確認

プレートから複数のコロニーを拾い、LB-アンピシリン培地で37°C一晩培養した。培養した大腸菌から、アルカリ-SDS法を用いてプラスミド DNAを回収した。回収したプラスミド DNAを適当な制限酵素で切断し、アガロース電気泳動によりベクター内に目的のPCR産物が組み込まれていることを確認した。

v) シーケンスの確認

回収したDNAをポリエチレングリコール沈殿法により精製し、ベクター内のPCR産物を、サンガー法に基づき蛍光シーケンサー (PERKINELMER) により確認した。これによりpAS Δ NdeI(+2)ベクターにヒトのXIAP遺伝子全長が組み込まれたpAS Δ NdeI(+2)-XIAP のプラスミドDNAを得た。

2. 2ハイブリッドスクリーニング

細胞内情報伝達機構の解析や高度な細胞機構の研究において、タンパク質間の相互作用を検出することや、既知のタンパク質と相互作用する未知あるいは既知の分子を同定することは非常に重要である。2ハイブリッドスクリーニングシステムは、2つの遺伝子のコードするタンパク質の相互作用の検出、あるいはある遺伝子産物と相互作用する分子のクローニング方法として注目を集めている。この方法は2つの遺伝子産物をそれぞれ転写因子のDNA結合部位 (GAL4-DNA-BD)と転写活性化部位 (GAL4-AD)に融合させ、両者の相互作用を転写活性を指標にして検出する。GAL4-DNA-BD融合蛋白質とGAL4-AD融合蛋白質を酵母の核内で同時に発現させる。両者が相互作用する場合、GAL4プロモーターを上流に持つHIS3遺伝子、lac Z遺伝子の転写翻訳が起こることが期待される。すなわち両者の蛋白質の相互作用がある場合のみ、その酵母は、ヒスチジンを除いた寒天培地上で生育が可能になり、 β -ガラクトシダーゼ (以下、 β -Galと省略する) 活性がX-galを基質として検出可能になる。この様に2ハイブリッドスクリーニングシステムは、タンパク質を精製せずに2つの遺伝子産物の相互作用が酵母核内という *in vivo* の条件下で判定できるという優れた特性を有している。しかしながら相互作用を示さずにGAL4プロモーターからの転写を起すタンパク質のスクリーニングは不可能である。そこで、GAL

4-DNA-BD融合蛋白質のみでlac Z遺伝子が発現しない、すなわち β -gal活性がないことを確認する事が非常に重要な事である。2ハイブリッドスクリーニングはCLONTECH社のMATCHMAKER 2ハイブリッド法 2を用い、実験方法は全てこのプロトコールに従った。

2-1) pray用のライブラリーDNAの精製

CLONTECH社より購入したHuman Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryをスクリーニング用のライブラリーに用いた。このライブラリーはpACT2ベクターで作製されており、GAL4-AD (GAL4蛋白質のActivation Domain) をコードする配列の下流にMCSがあり、このMCSにcDNA断片が挿入されている。2ハイブリッド法において、未知の結合因子を含むと思われるライブラリーをprayと呼ぶ。直径150mmのLBアンピシリンプレート100枚に1枚あたり約20,000個のコロニーをで30°Cで一晩培養し、菌体をLBアンピシリン液体培地で30°Cで4時間培養した。集菌した大腸菌からプラスミドDNAをポリエチレングリコール沈殿法により回収精製した。

2-2) 融合タンパク質の発現確認と β -gal活性がないことの確認

構築したpAS Δ NdeI(+2)-XIAPで酵母を形質転換し、XIAPがGAL4-DNA-BD融合蛋白質として発現すること、ならびにGAL4-DNA-BD融合XIAP(bait)が単独でGAL4プロモーターを活性化し、lac Z遺伝子が発現しないことを確認した。

酢酸リチウム法(Gietz, D., Jean, A., Woods, R. A., & Schiestl, R. H. 1992, Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acid Res. 20:1425)によりコンピテント化された酵母Y190に、pAS Δ NdeI(+2)-XIAPのプラスミドDNAを用いて形質転換した。形質転換により得られたコロニーを、SD/-Trp液体培地で30°C 3日間培養した。培養後に酵母菌体を遠心分離により集め、尿素/SDS蛋白抽出バッファーを用いて常法(Printen, J. A. & Sprague, G. F., Jr. (1994) Protein interactions in the yeast pheromone response pathway : Step 5 interacts with all members of the MAP kinase cascade. Genetics 138 : 609-619)により酵母よりタンパク質を抽出した。SDS-PAGEによりタン

パク質を泳動後、PVDFメンブレンに蛋白質をブロッティングした。anti-GAL4 DNA binding domain monoclonal antibody (CLONTECH社製)とanti-XIAP ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットにより、GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質が発現していることを確認した。

GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質の発現が確認された酵母の形質転換体を生育させたプレートに、滅菌したナイロントランスファーメンブレン (Amersham社製、Hybond-N+) をのせ、コロニーをメンブレンにトランスファーした。このメンブレンを液体窒素に10秒間浸した後、室温に戻し、コロニーがついている面を上にし、Z-buffer / X-gal 溶液 (100ml Z-buffer (16.1g/L Na₂HPO₄-7H₂O、5.50g/L NaH₂P₂O₄-H₂O、0.75g/L KCl、0.246g/L MgSO₄-7H₂O、pH7.0に調整)、0.27ml メルカプトエタノール、1.67ml X-gal 溶液 (20mg/ml X-gal in DMFA)) を浸した濾紙の上に置き、30°Cで1時間以上静置した。この結果GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質の発現が確認された酵母の形質転換体は青くならなかった。すなわちGAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質単独ではGAL4プロモーターからの転写を活性化せず、2 ハイブリッド スクリーニングシステムに使用可能であることが確認できた。

2-3) 1次スクリーニング

GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質の発現が確認された酵母の形質転換体を大量培養し、酢酸リチウム法によりコンピテント化した。これを先に調製したHuman Placenta MATCHMAKER cDNA Library で形質転換した。得られた形質転換体をSD/-Trp/-Leu/-His/+3-ATのプレートにストリークし、7日間 30°Cで培養した。これにより、baitとpreyが結合しGAL4プロモータの下流にあるHis3遺伝子が発現しHis+になった酵母だけが生育しコロニーを生じる。用いたライブラリーのindependent clonesは 5×10^6 に対して実際にスクリーニングしたのは 72.5×10^7 であり約5倍量のスクリーニングが行えた。この1次スクリーニングでHis+になった酵母は82クローンであった。

2-4) 2次スクリーニング; β -gal アッセイ

1次スクリーニングで得られたクローンにおいて、本当にbaitとpreyが結合しGAL4プロモータの下流遺伝子を発現させているかを調べるために、もう1つのGAL4プロモータの下流にあるlac Z遺伝子が発現しているかどうか、すなわち β -gal活性をもつかどうかを調べた。SD/-Trp/-Leu/-His/+3-ATの寒天プレートにナイロントランスファーマンブレンをのせ、このメンブレン上に1次スクリーニングでHis+になった酵母82クローンを培養生育させた。コロニーリフトフィルターアッセイによる β -gal活性測定により、His+かつ β -gal活性を持つクローンを得た。この2次スクリーニングにより74個の β -gal活性を有するコロニーを得た。

2-5) prayの配列決定

スクリーニングで得られたクローンに挿入されているDNA配列を調べるために、酵母からプラスミドDNAを回収し大腸菌に移した。

まずHis+で、かつ β -gal活性を持つ酵母のクローンをプレートから掻き取り、SD/-Leu培地で一晚培養した。集菌後菌体を常法(Kaiser, P. & Auer, B. (1993) Rapid shuttle plasmid preparation from yeast cells by transfer to E. coli. Bio Techniques 14 : 552)に従い処理し、酵母プラスミドDNAを回収した。

HEPES-NaOHを用いてのコンピテント化されたエレクトロポレーション用の大腸菌HB101を、酵母から回収したプラスミドDNAでエレクトロトランスフォームした。エレクトロポレーション後、37°Cに温めておいたSOC培地を加え、37°Cで1時間震盪し回復培養を行なった。培養後、-Leuプレート(50 μ g/ml アンピシリン、40 μ g/ml プロリン、1mM 塩酸チアミン、-Leuドロップアウト溶液を含むM9 プレート)にスプレッドし、37°Cで一晩培養した。大腸菌HB101はleuB変異を持っており、酵母から得られたプラスミドDNAのうち、leuB変異を相補できるLEU2遺伝子をコードするライブラリーベクターのみが大腸菌HB101をトランスフォームし、プレート上にコロニーを形成することができる。生育した大腸菌HB101からのプラスミドDNAをアルカリ-SDS法で抽出した。回収したプラスミドDNAを用い、大腸菌DH5 α をトランスフォームした。

大腸菌DH5 α 内のpACT2ベクターのプラスミドDNAをアルカリ-SDS法により回収し、ポリエチレングリコール沈殿法により精製した。サンガー法に基づき蛍光シーケンサーによりベクター内の遺伝子の塩基配列を確認した。これにより、新規遺伝子X19を得た。

2-6) 再トランスフォームによる確認

精製したpACT2-X19のプラスミドDNAで酵母Y190をトランスフォームした後、 β -gal活性測定を行なうことにより、GAL4-AD蛋白質とX19との融合蛋白質単独ではGAL4プロモーターからの転写を起こさないことを確認した。また、pAS Δ NdeI(+2)-XIAPとpACT2-X19によってトランスフォームしたY190の β -gal活性測定、およびpAS-X19とpACT-XIAPによってトランスフォームしたY190の β -gal活性測定によりGAL4プロモーターからの転写が起こっていること、すなわちXIAPとX19が酵母核内で結合することを確認した。

3. X19アミノ酸配列相同性検索

X19の機能をアミノ酸配列上から予測するために、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター及び京都大学化学研究所スーパーコンピューターラボラトリーのwwwサービス (<http://www.genome.ad.jp>) を用いて、アミノ酸配列相同性検索を行なった。

3-1) 配列相同性検索プログラムBLAST

ノンリダントアミノ酸配列データベースnr-aaを用いてのX19のアミノ酸配列に相同な配列の検索を行なった (blastp search)。その結果X19はhuman thioredoxin reductase、human glutathione reductaseにそれぞれ55%、38%のホモロジーを有する新規遺伝子であった。更にhuman thioredoxin reductaseにおいて報告されている機能領域 (レドックス活性中心、FAD結合領域、NADPH結合領域、セレノシステイン活性中心) が完全に相同に保存されていた (図1、配列1)。よって我々はX19をヒト・チオレドキシンレダクターゼII (human thioredoxin reductase II; TxRII) と命名した。

4. TxR11の全長cDNAの獲得

4-1) コロニーハイブリダイゼーションによる全長cDNAの獲得

Human Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryから、コロニーハイブリダイゼーションによりTxR11の全長cDNAを獲得した。スクリーニングには、配列決定されたTxR11の部分配列からPCR法でDNA断片を増幅し、これをプローブとして用いた。

i)コロニーハイブリダイゼーション用メンブレンの作製

Human Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryを希釈し、直径150mmのLB (ampicillin) プレート 1枚当たり 4×10^4 個以上のコロニーが生育するようにまいた。これを12枚用意し、30°Cで一晩培養した。ハイブリダイゼーション用メンブレンにコロニーを移し、常法に従いコロニーハイブリダイゼーション用メンブレンを作製した。

ii)プローブの作製

TxR11のcDNAを鋳型に下記のプライマーを用いPCRでN末端側約500bpのDNA断片を得た。

TxR11-sF3 5' - TAT GAT CTC CTG GTG GTC - 3'

TxR11-sR2 5' - GTC ATC ACT TGT GAT TCC - 3'

増幅されたDNA断片を1%アガロースゲル電気泳動で分離し、グラスマトリクス法により精製した。精製したDNA断片は、DNAランダムラベリングキット (amersham社製、rediprime DNA labelling system) と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ deoxy-CTP (ICN社製) で ^{32}P ラベルされたプローブを作製し、スピンカラム (pharmacia社製、ProbeQuant G-50 Micro Column) で精製した。

iii)ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは、ハイブリボトルおよびハイブリオープン (タイテック社製) を用いて行なった。DNAをクロスリンクさせたメンブレンは、ハイブリダイゼーションバッファー (10% PEG6000、1.5% SSPE、7% SDS) で65°C、1時間プレハイブリダイズした。 ^{32}P ラベルされたプローブを煮沸し急冷した後、65°Cに温めたハイブリバッファーで希釈し、プレハイブリダイゼーションに用いた液と交換した。

ハイブリダイゼーションは65°Cで一晩行なった。

iv) 洗浄とオートラジオグラフィー

0.1×SSC、0.1% SDSの洗浄液でハイブリダイゼーションバッファーを洗い、適宜サーベイメーターで洗いの程度を確認した。洗浄液のカウントが無くなるまで数回洗浄液を換え、完全にカウントが無くなったら、メンブレンにフィルムをのせ、オートラジオグラフィーにより陽性コロニーを検出した。

v) ポジティブコロニーの単離

パスツールピペットによりポジティブコロニーを単離し、これを希釈倍率を変えて直径100mmのLB (ampicillin)プレートにまき、30°Cで一晩培養した。以下同様の方法でハイブリダイゼーションを行い、単一ポジティブコロニーを得た。これよりプラスミドDNAを回収しそのDNA配列を決定した。こうして決定した塩基配列が配列番号：1に示すTxRII α のcDNAである。

4-2) PCRクローニングによる全長cDNAの獲得

2ハイブリッドで用いたHuman Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryから、TxRII特異的なプライマーとライブラリーベクター特異的なプライマーを組み合わせPCR法によるTxRII遺伝子の獲得を試みた。用いたプライマーの配列は、コロニーハイブリダイゼーションによって得られたクローンの塩基配列に基づき、以下のように設定した。

TxRII特異的プライマー1

5' - ACA GCT TCT GCC ATC TTC CTC -3'

TxRII特異的プライマー2

5' - AGA AGG TTC CAC GTA GTC CAC - 3'

ライブラリーベクター特異的なプライマー

5' - CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC - 3'

PCRは、TxRII特異的プライマー1とライブラリーベクター特異的なプライマーの組み合わせで、GeneAmp PCR System 2400 (PERKINELMER)を用い、下記のプログラム

で行った。

a) 94°C 5min.

b) 94°C 30s、56°C 30s.、72°C 1min.30sを35サイクル

d) 72°C 10min.

PCR産物を1%アガロースで電気泳動後、切り出して精製し次のPCRのテンプレートとした。2回目のPCRはTxRII特異的プライマー2とライブラリーベクター特異的なプライマーの組み合わせで、下記のプログラムで行った。

a) 94°C 5min.

b) 94°C 30s、56°C 30s.、72°C 1min.30sを35サイクル

d) 72°C 10min.

PCR産物を1%アガロースで電気泳動後、切り出して精製しTopo TA cloning Kit (Invitrogen)を用いてクローニングし、PCR産物のDNA配列をシーケンスした。その結果約180bpの5'-非アミノ酸翻訳領域を含むcDNAが得られ、最初のメチオニン(Met)の直前にKozak consensusがある事などからこれが最初のMetであると断定した。しかしながらN末端側の配列は、酵母の2ハイブリッド法で得られたものと異なっていた。この遺伝子はTxRIIの2つ目のエキソン以降は全く同一であることから、TxRIIのオールターネイティブスプライシングフォームであると結論した。酵母の2ハイブリッド法で得られたものをTxRII α 、オールターネイティブスプライシングフォームをTxRII β と呼ぶことにした。TxRII β はTxRII α の2番目のエキソン以降は全く同一の遺伝子であった(配列番号：3)。

更にTxRIIsのcDNA塩基配列に基づいて公知のゲノムの塩基配列を検索したところ、22q11.2にマッピングされることが確認された。TxRIIsをコードする遺伝子は、いずれもこの領域の70kbpの中に18のエキソンに分かれて存在していた。この領域にXIAPとの結合活性や、あるいはTxR活性を持ったタンパク質をコードする遺伝子の存在は、まったく予想されていない。

5. 抗TxRII抗体の作製

ヒトTxRII蛋白質に対する抗体を作製するために、免疫原としてGST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) 蛋白質との融合蛋白質を精製し、マウスに免疫することで、抗 TxRIIマウス抗血清を回収した。

5-1) GST-TxRII α 融合蛋白質の発現

pACT2-TxRII α からTxRII α フラグメントを pGEX ベクター (pharmacia社製) にリクローニングし、pGEX-TxRII α を構築した。このpGEX-TxRII α でトランスフォームされている大腸菌 (DH5 α) をLB-アンピシリン培地で37°Cで一晩培養した。その培養液を新しいLB-アンピシリン培地に100倍希釈になるように加え 37°Cで培養した。培養液の濁度が 0.6 付近となったところでGST-TxRII α 融合蛋白質を発現誘導するために IPTG (isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside) を終濃度 0.5mM になるように添加し、さらに4時間37°Cで培養した。培養後遠心により集菌した。

回収した菌体を氷冷した1% Tween- 20を含むPBSによく懸濁し、超音波破壊により菌体を完全に破碎した。破碎液を遠心し上清を、GSH-セファロース4Bカラム (pharmacia社製) に通してGST融合タンパク質をカラム吸着させた。カラムをWE buffer (10mM β -メルカプトエタノール、2mM MgCl₂、20mM Tris-HCl (pH7.5)) で十分に洗浄した後、G buffer (10mM GSH、50mM Tris-HCl, pH9.6) を用いてGST-TxRII α 融合蛋白質を溶出した。溶出液を50% glycerol / PBSで濃縮およびバッファの置換を行なった。

5-2) GST-TxRII α 融合蛋白質のマウスへの免疫、採血、反応性の確認

精製したGST-TxRII α 融合蛋白質とフロイト完全アジュバンドをエマルジョン化し、ネズミの腹腔内に注射した。この操作を毎週5週間続けたのち採血し、抗TxRII抗体を含む血清を回収した。この抗血清を使ったウエスタンブロッティング法により、免疫原、哺乳動物細胞で過剰発現させたTxRII、および各種培養細胞で反応性を確認した。

6. ウエスタンブロッティング法 (図2)

培養細胞より可溶性蛋白質を調製し、常法(M. M. Bradford, Anal. Biochem. 72, 248, 1976)に従いタンパク質濃度を測定し、1レーン当たり40 μ g タンパク質 になるようにSDS-PAGEを行った。これを抗TxRII抗血清でイムノディテクションし、各培養細胞株に内在するTxRII蛋白質の存在を確認した。この結果、各種培養細胞でTxRIIの発現が確認できた。なお図2において、70 kDa付近のバンドがTxRII α であり、55 kDa付近のバンドがTxRII β である。またマウスやラットの培養細胞ではTxRII β の発現が確認できなかった。試料とした培養細胞は次の11種である。

Raji ヒトのパーキットリンパ腫由来の細胞株

Jurkat ヒトのT-cell-急性リンパ芽球性白血病由来の細胞株

HL60 ヒトの急性前骨髄性白血病由来の細胞株

U937 ヒトの組織球性リンパ腫由来の細胞株

ZR75-1 ヒトの上皮性乳癌由来の細胞株

HepG 2 ヒトの原発性肝芽細胞腫由来の細胞株

HeLa ヒトの子宮頸癌由来の細胞株

A 431 ヒト外陰部の扁平上皮癌由来の細胞株

MRC-5 ヒト由来の正常線維芽細胞株

NIH/3T3 マウスの胎児由来の正常線維芽細胞株

Rat-1 ラットの胎児由来の正常線維芽細胞株

7. 組み換えTxRII α タンパク質の精製と活性測定

7-1) ヒスチジン-タグ融合TxRII α タンパク質の調製

哺乳動物細胞発現ベクターであるpcDNAHisにTxRII α の3' UTRを含む遺伝子全長(配列番号: 1)をサブクローニングした。このプラスミドDNAを哺乳動物細胞にトランスフェクションすることによりN末端側にヒスチジン-タグが付加されたTxRII α タンパク質が細胞内で過剰発現される。常法に従いリボフェクション法により293T細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で細胞を回収し、ヒスチジン-タグ融合タンパク質精製用キットを用いて目的のタンパク質

を精製した。

7-2) フラッグ-タグ融合TxRII α タンパク質の精製

哺乳動物細胞発現ベクターであるpcDNAFlagにTxRII α の3' UTRを含む遺伝子全長をサブクローニングした。このプラスミドDNAを哺乳動物細胞にトランスフェクションすることにより、セレノシステインがタンパク質に取り込まれ、TxRII α のC末端側にフラッグ-タグが付加されたタンパク質のみ、anti-Flag 抗体親和性カラムで回収することが可能になる。

常法に従いリポフェクション法により293T細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で細胞を回収し、細胞抽出液をanti-Flag 抗体親和性カラムに通し、Flagのペプチドを用いてフラッグ-タグ融合TxRII α タンパク質を回収した。

7-3) MYC-タグ融合TxRII α タンパク質の精製

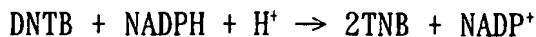
哺乳動物細胞発現ベクターであるpCMVmycにTxRII α の3' UTRを含む遺伝子全長をサブクローニングした。このプラスミドDNAを哺乳動物細胞にトランスフェクションすることにより、TxRII α のN末端側にMYC-タグが付加されたタンパク質が過剰発現される。常法に従いリポフェクション法により293T細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で細胞を回収し、細胞抽出液にanti-MYC モノクローナル抗体を結合させたプロテインAセファロースを加え、4°Cで2時間穏やかに攪拌した。遠心により、anti-MYC モノクローナル抗体を結合させたプロテインAセファロースに結合したMYC-タグ融合TxRII α タンパク質を沈殿させ、上清を取り除き、NETN buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.5% NP-40, 150mM NaCl) で数回洗浄した。

7-4) 活性測定

常法(Holmgren, A. and Bjornstedt, M.1995,[21] Thioredoxin and Thioredoxin Reductase Methods in Enzymol 252:199)にしたがって、DTNBアッセイ、およびインシュリンアッセイにより、TxRの活性を測定した。

i) DNTBアッセイ

DNTBアッセイは、次の反応式に基づいて、DTNBからTxR活性によって生じるTNBを412nmのチオール吸収で測定する方法である。精製したタグ融合TxRII α タンパク質(1~50 μ l)をアッセイ用バッファー1に加え全量を1.0 mlとした。25°Cで5 分間、412nmの吸光度を測定した(図3)。



アッセイ用バッファー1:

100 mM potassium phosphate pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.25 mM NADPH, 0.2mg/ml bovine serum albumin (BSA), 1% ethanol, 1 mM DTNB

その結果、3通りの方法で精製したTxRII α は、全てコントロールに用いた大腸菌由来のTxRと同等の活性を有することが判明した。ヒスチジンとMyc-タグ融合TxRII α タンパク質の活性が若干低いのはC末端側にセレノシステインが取り込まれていないTxRII α が混入しているため、反応を阻害しているものと考えられる。

ii) インシュリンアッセイ

精製したタグ融合TxRII α タンパク質(1~50 μ l)をアッセイ用バッファー2に加え全量を1.0 mlとした。30°Cで5 分間、NADPHの酸化を340nmによる吸光度の減少によって測定した(図4)。TxR活性によってTrxが還元され、還元型Trxが更にインシュリンの還元を進める。このときに、酸化されるNADPHの量からTxR活性を測定することができる。酸化されたNADPHの量は以下の計算式で算出した。

$$\Delta A_{340} \times 0.5 / 6.2$$

アッセイ用バッファー2:

50 mM リン酸緩衝液pH 7.0、20 mM EDTA、80 mMインシュリン、0.25mM NADPH、16 mM 大腸菌Trx-S2

この結果、3通りの方法で精製したTxRII α は、全てコントロールに用いた大腸菌由来のTxRと同等の活性を有することが判明した。ヒスチジンとミック-タグ融合TxRII α タンパク質の活性が若干低いのはC末端側にセレノシステインが取り込ま

れていないTxR II α が混入しているため、反応を阻害しているものと考えられる。

7-5) 阻害剤アッセイ

組み換え体として得られた本発明によるTxR II sの酵素活性と、天然のTxRの活性とを比較するために、阻害剤がどのような影響を及ぼすか観察した。TxR活性の阻害剤には、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(CDNB)と13-シス-レチノイン酸を用いた。またTxR活性の確認には、DNTBアッセイを利用した。

阻害剤の希釈系列を0.2 mlのHEバッファー(100 mM HEPES buffer pH 7.2, 5 mM EDTA)で調製し0.2 ml分注した。3 μ Mのタグ融合TxR II α タンパク質を調製して0.2 mL加え、続いて3 mM NADPHと30 mM DTNBを含むHEバッファー0.2 mlを加えた。この溶液の反応系は100 mM HEPES buffer pH 7.2, 5 mM EDTA、1 μ Mのflag-タグ融合TxR II α タンパク質、1 mM NADPHと10 mM DTNBになる。25°Cで5 分間、還元されたインシュリンの量を412 nmのチオール吸収で測定した。結果は図5に示す。

この結果、精製されたフラグ-タグ融合TxR II α タンパク質はこれまでにTxR Iの文献で報告されているように、CDNB と13-シス-レチノイン酸によって効果的にその活性が阻害されることが明らかになった。本発明によるTxR II α は、公知のTxRと同様の機作により酵素活性を発現しているものと推測された。

産業上の利用の可能性

高等動物のTxRについては1990年代に酵素としてはじめて精製され、アミノ酸配列が報告されたのは1995年になってからである。高等動物のTxRは、タンパク質の大きさや基質特異性において、それまでに報告されていた下等動物のホモログと相違していたため注目されていた。しかし、ヒトにおけるTxR II sの存在については予測すらされておらず、本発明によって明らかにされたTxR II sの構造と活性には大きな意義がある。以下に本発明の意義を具体的に述べる。

本発明は、抗がん剤のスクリーニングにおいて重要な情報を与える。TxRが抗がん剤のターゲットとして注目されていることは既に述べた。そのターゲットに複数

種の分子が存在したことを明らかにした点において、本発明の意義は大きい。すなわち、より確実な治療効果をもたらすためには、本発明によるTxRILsを含めたTxR活性を総合的に制御するためのアプローチが求められる。このような取り組みは本発明の知見によってはじめて可能となる。

本発明によって提供されるcDNAには、TxRILsのC末端付近に存在するセレノシステインの翻訳に必要なステムループ構造を構成する3' UTRが存在する。この塩基配列がTxR活性の発現に必須とされているセレノシステインを含む領域の発現を支えている。本発明において明らかにした3' UTRはわずか130bpで構成され、このような短い配列によってセレノシステインの翻訳が可能になることは新規な知見である。更にXIAP結合性タンパク質を単離したという側面から本発明を見れば、本発明によるタンパク質はアポトーシスの抑制をつかさどっているXIAPに結合し、その機能を制御しうる可能性を持っている。このような可能性を通じて、本発明はアポトーシスの促進のための新たな技術を提供する。アポトーシスの促進は、がんやウイルス感染細胞のような異常細胞の死を誘導することによって疾患の治療につながる。

請求の範囲

1. 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
2. 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列において、
1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して60%以上のホモロジーを持つチオレドキシソレダクターゼ活性を有するタンパク質。
3. 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、チオレドキシソレダクターゼ活性を有するタンパク質。
4. 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列において、
1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、XIAP結合活性を有するタンパク質。
5. 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、XIAP結合活性を有するタンパク質。
6. 請求項1-5のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。
7. 請求項1-5のいずれかに記載のタンパク質をコードするcDNA。
8. 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基酸配列のタンパク質コード領域からなるcDNA。
9. 請求項7または8に記載のDNAが挿入されたベクター。
10. 請求項9に記載のベクターを保持する形質転換体。
11. 請求項10に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1-5のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

- 1 2. 請求項 7 に記載の cDNA 若しくはその一部に対するアンチセンス DNA。
- 1 3. 請求項 7 に記載の cDNA にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を持つオリゴヌクレオチド。
- 1 4. 以下に示す第 1 エキソンまたは第 2 エキソン、および第 3 - 第 19 エキソンを含み、チオレドキシンレダクターゼ活性を持つタンパク質をコードする DNA。

第 1 エキソン：配列番号：1 8

第 2 エキソン：配列番号：1 9

第 3 エキソン：配列番号：2 0

第 4 エキソン：配列番号：2 1

第 5 エキソン：配列番号：2 2

第 6 エキソン：配列番号：2 3

第 7 エキソン：配列番号：2 4

第 8 エキソン：配列番号：2 5

第 9 エキソン：配列番号：2 6

第 10 エキソン：配列番号：2 7

第 11 エキソン：配列番号：2 8

第 12 エキソン：配列番号：2 9

第 13 エキソン：配列番号：3 0

第 14 エキソン：配列番号：3 1

第 15 エキソン：配列番号：3 2

第 16 エキソン：配列番号：3 3

第 17 エキソン：配列番号：3 4

第 18 エキソン：配列番号：3 5

第 19 エキソン：配列番号：3 6

- 1 5. 配列番号：3 7 で示される請求項 1 4 に記載の DNA。

16. 配列番号：18－配列番号：36のいずれかに記載の塩基配列またはその部分配列にハイブリダイズするDNAであって、ヒト染色体22q11.2にハイブリダイズしうるDNA。
17. 配列番号：37に記載の塩基配列のうち、配列番号：18－配列番号：36に記載された塩基配列を除く部分、またはその一部とハイブリダイズしうるDNA。
18. 下記の工程を含む、XIAPとその結合因子との結合を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。
- (a) スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを、請求項2に記載のタンパク質と同時に接触させるか、または
 - (a)' スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを接触後に、請求項2に記載のタンパク質を更に接触させ、
 - (b) XIAPに結合したおよび／またはしなかった請求項2に記載のタンパク質の量を決定し、
 - (c) XIAPと請求項2に記載のタンパク質との結合を抑制する化合物を選択する
19. 下記の工程を含む、チオレドキシンレダクターゼIIの酵素活性を促進、または抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。
- (a) スクリーニングの対象となる候補物質を請求項1－3に記載のタンパク質と接触させる工程、
 - (b) 請求項1－3に記載のタンパク質のチオレドキシンレダクターゼ活性の変化を観察する工程、および
 - (c) チオレドキシンレダクターゼIIの酵素活性を促進、または抑制する化合物を選択する工程

図 2

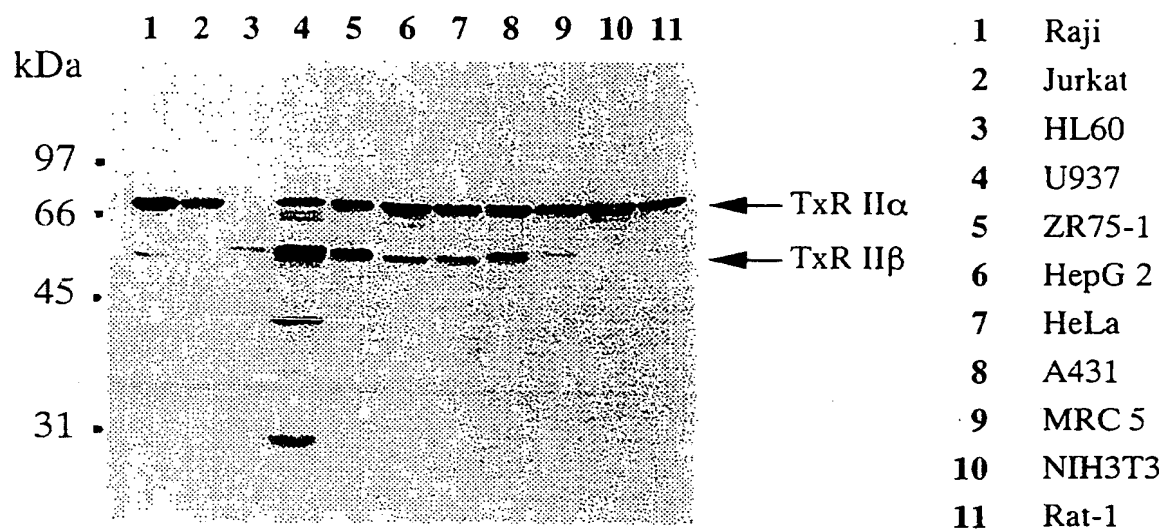




図 3

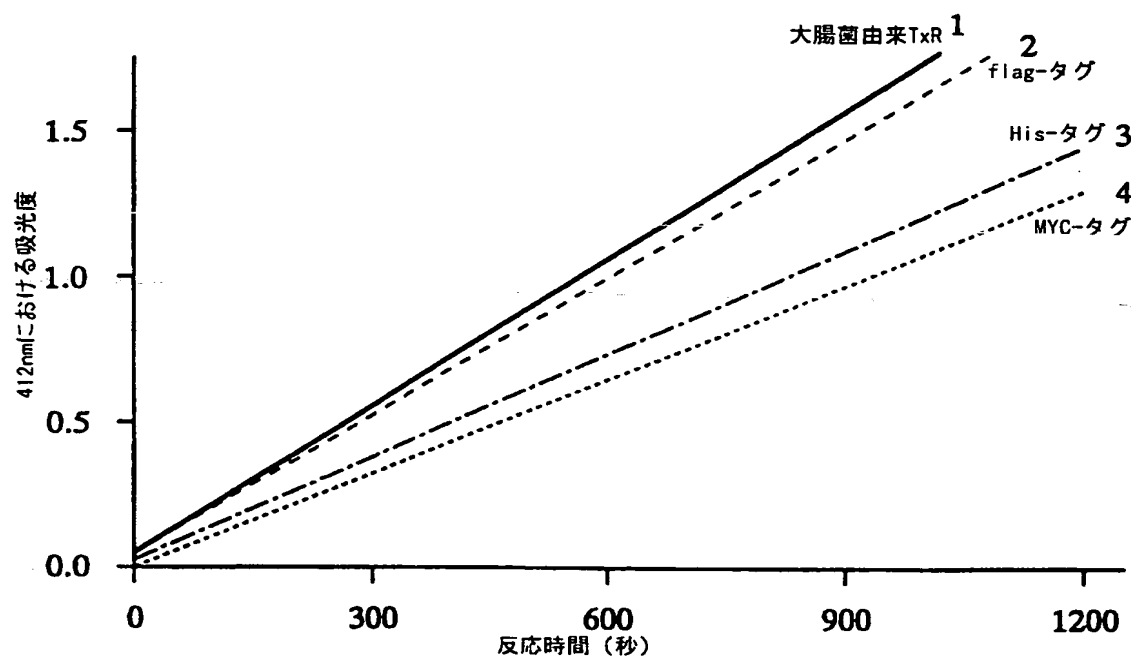




図 4

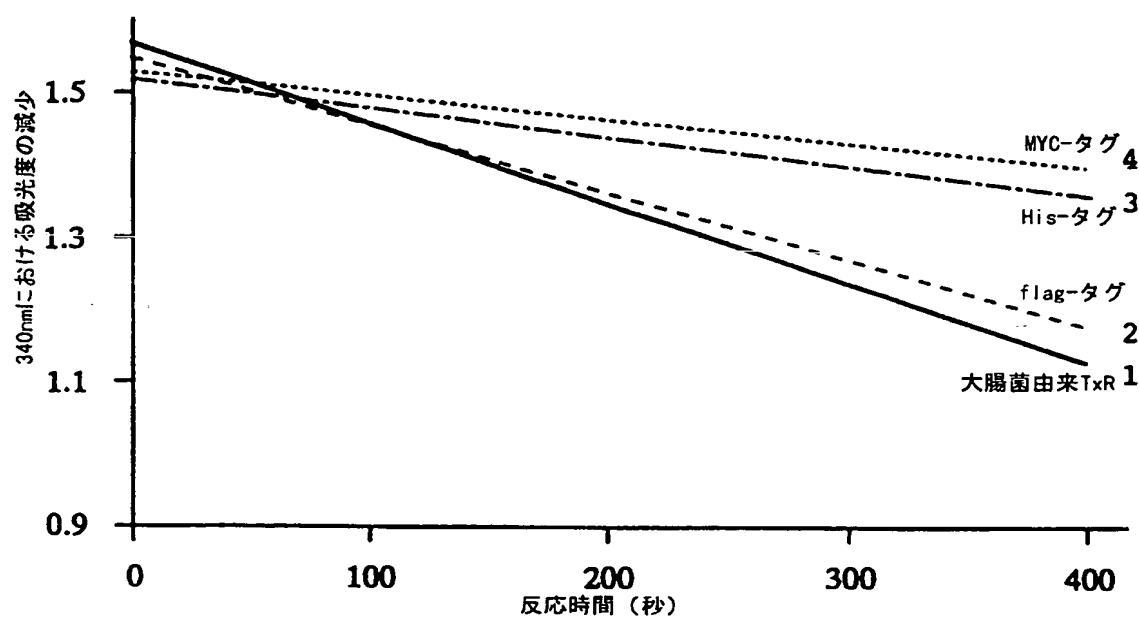
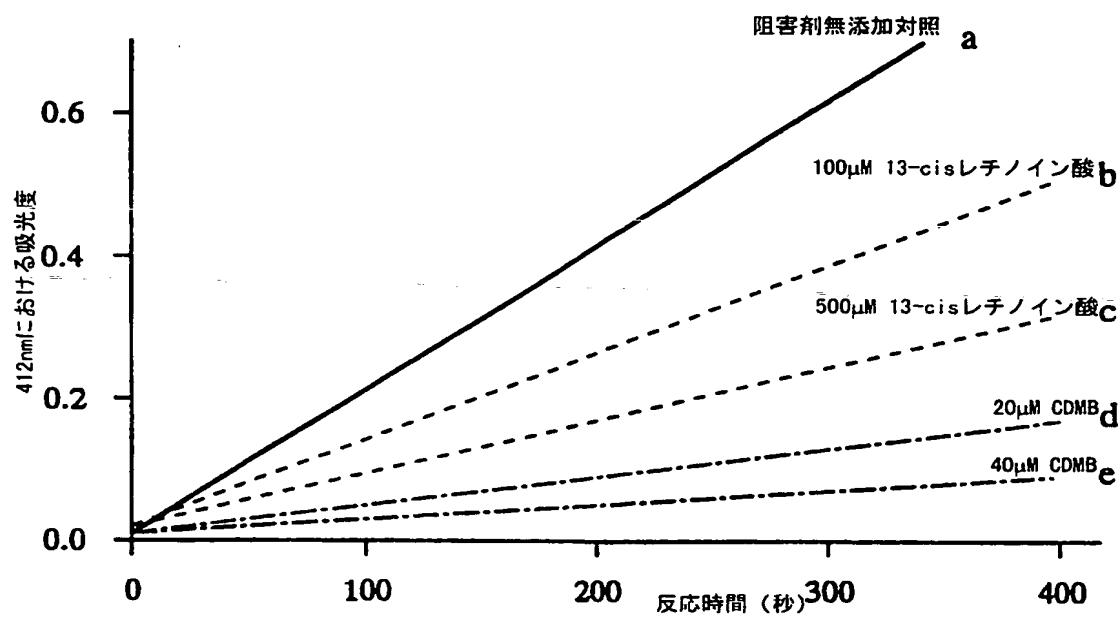


図 5



配列表
SEQUENCE LISTING

<110> Medical & Biological Laboratories Co.,Ltd.
株式会社医学生物学研究所

<120> Thioredoxin reductase II
チオレドキシンレダクターゼ I I

<130> M3-007PCT

<140>

<141>

<150> JP 1998-310422

<151> 1998-10-30

<160> 37

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1959

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (10)..(1572)

<220>

<221> misc_structure

<222> (1567)..(1569)

<220>

<221> misc_structure

<222> (1664)..(1666)

<223> tga is transrated to selenosysteine, shown by Xaa.

<400> 1

atggcggca atg gcg gtg gcg ctg cgg gga tta gga ggg cgc ttc cgg tgg 51

Met Ala Val Ala Leu Arg Gly Leu Gly Gly Arg Phe Arg Trp

1

5

10

cgg acg cag gcc gtg gcg ggc ggg gtg cgg ggc gcg gcg cgg ggc gca 99

Arg Thr Gln Ala Val Ala Gly Gly Val Arg Gly Ala Ala Arg Gly Ala

15

20

25

30

gca gca ggt cag cgg gac tat gat ctc ctg gtg gtc ggc ggg gga tct 147

Ala Ala Gly Gln Arg Asp Tyr Asp Leu Leu Val Val Gly Gly Gly Ser

35

40

45

ggt ggc ctg gct tgt gcc aag gag gcc gcc cag ctg gga agg aag gtg 195

Gly Gly Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Gln Leu Gly Arg Lys Val

50

55

60

gcc gtg gtg gac tac gtg gaa cct tct ccc caa ggc acc cgg tgg ggc 243

Ala Val Val Asp Tyr Val Glu Pro Ser Pro Gln Gly Thr Arg Trp Gly

65

70

75

ctc ggc ggc acc tgc gtc aac gtg ggc tgc atc ccc aag aag ctg atg 291

Leu Gly Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met

80

85

90

cac cag gcg gca ctg ctg gga ggc ctg atc caa gat gcc ccc aac tat 339

His Gln Ala Ala Leu Leu Gly Gly Leu Ile Gln Asp Ala Pro Asn Tyr

95

100

105

110

ggc tgg gag gtg gcc cag ccc gtg ccg cat gac tgg agg aag atg gca 387

Gly Trp Glu Val Ala Gln Pro Val Pro His Asp Trp Arg Lys Met Ala

115

120

125

gaa gct gtt caa aat cac gtg aaa tcc ttg aac tgg ggc cac cgt gtc 435
Glu Ala Val Gln Asn His Val Lys Ser Leu Asn Trp Gly His Arg Val
130 135 140

cag ctt cag gac aga aaa gtc aag tac ttt aac atc aaa gcc agc ttt 483
Gln Leu Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn Ile Lys Ala Ser Phe
145 150 155

gtt gac gag cac acg gtt tgc ggc gtt gcc aaa ggt ggg aaa gag att 531
Val Asp Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys Gly Gly Lys Glu Ile
160 165 170

ctg ctg tca gcc gat cac atc atc att gct act gga ggg cgg ccg aga 579
Leu Leu Ser Ala Asp His Ile Ile Ile Ala Thr Gly Gly Arg Pro Arg
175 180 185 190

tac ccc acg cac atc gaa ggt gcc ttg gaa tat gga atc aca agt gat 627
Tyr Pro Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr Gly Ile Thr Ser Asp
195 200 205

gac atc ttc tgg ctg aag gaa tcc cct gga aaa acg ttg gtg gtc ggg 675
Asp Ile Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly
210 215 220

gcc agc tat gtg gcc ctg gag tgt gct ggc ttc ctc acc ggg att ggg 723
Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe Leu Thr Gly Ile Gly
225 230 235

ctg gac acc acc atc atg atg cgc agc atc ccc ctc cgc ggc ttc gac 771
Leu Asp Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro Leu Arg Gly Phe Asp
240 245 250

cag caa atg tcc tcc atg gtc ata gag cac atg gca tct cat ggc acc 819
Gln Gln Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met Ala Ser His Gly Thr
255 260 265 270

cgg ttc ctg agg ggc tgt gcc ccc tgc cgg gtc agg agg ctc cct gat 867
 Arg Phe Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val Arg Arg Leu Pro Asp
 275 280 285

ggc cag ctg cag gtc acc tgg gag gac agc acc acc ggc aag gag gac 915
 Gly Gln Leu Gln Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr Thr Gly Lys Glu Asp
 290 295 300

acg ggc acc ttt gac acc gtc ctg tgg gcc ata ggt cga gtc cca gac 963
 Thr Gly Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile Gly Arg Val Pro Asp
 305 310 315

acc aga agt ctg aat ttg gag aag gct ggg gta gat act agc ccc gac 1011
 Thr Arg Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val Asp Thr Ser Pro Asp
 320 325 330

act cag aag atc ctg gtg gac tcc cgg gaa gcc acc tct gtg ccc cac 1059
 Thr Gln Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala Thr Ser Val Pro His
 335 340 345 350

atc tac gcc att ggt gac gtg gtg gag ggg cgg cct gag ctg aca ccc 1107
 Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg Pro Glu Leu Thr Pro
 355 360 365

aca gcg atc atg gcc ggg agg ctc ctg gtg cag cgg ctc ttc ggc ggg 1155
 Thr Ala Ile Met Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln Arg Leu Phe Gly Gly
 370 375 380

tcc tca gat ctg atg gac tac gac aat gtt ccc acg acc gtc ttc acc 1203
 Ser Ser Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr
 385 390 395

cca ctg gag tat ggc tgt gtg ggg ctg tcc gag gag gag gca gtg gct 1251
 Pro Leu Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu Glu Glu Ala Val Ala
 400 405 410



cgc cac ggg cag gag cat gtt gag gtc tat cac gcc cat tat aaa cca 1299
 Arg His Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His Ala His Tyr Lys Pro
 415 420 425 430

ctg gag ttc acg gtg gct gga cga gat gca tcc cag tgt tat gta aag 1347
 Leu Glu Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser Gln Cys Tyr Val Lys
 435 440 445

atg gtg tgc ctg agg gag ccc cca cag ctg gtg ctg ggc ctg cat ttc 1395
 Met Val Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val Leu Gly Leu His Phe
 450 455 460

ctt ggc ccc aac gca ggc gaa gtt act caa gga ttt gct ctg ggg atc 1443
 Leu Gly Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Leu Gly Ile
 465 470 475

aag tgt ggg gct tcc tat gcg cag gtg atg cgg acc gtg ggt atc cat 1491
 Lys Cys Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg Thr Val Gly Ile His
 480 485 490

ccc aca tgc tct gag gag gta gtc aag ctg cgc atc tcc aag cgc tca 1539
 Pro Thr Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg Ile Ser Lys Arg Ser
 495 500 505 510

ggc ctg gac ccc acg gtg aca ggc tgc tga ggg taagcgccat cctgcaggc 1592
 Gly Leu Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly
 515 520

cagggcacac ggtgcgccg ccgccagctc ctggaggcc agaccagga tggctgcagg 1652

ccaggtttgg ggggcctcaa cctctcctg gacgcctgt gagatggtca gcgtggagcg 1712

caagtctgg acgggtggcc cgtgtgcccc acagggatgg ctgaggggac tgtccacctc 1772

accctgcac ctttcagcct ttgccgccg gcaccccccc caggctcctg gtgccggatg 1832



atgacgacct gggtagaaac ctaccctgtg ggcacccatg tccgagcccc ctggcatttc 1892

tgcaatgcaa ataaagaggg tactttttct gaagtgtgta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1952

aaaaaaaa 1959

<210> 2

<211> 521

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Xaa(520) means selenosysteine.

<400> 2

Met Ala Val Ala Leu Arg Gly Leu Gly Gly Arg Phe Arg Trp Arg Thr
1 5 10 15

Gln Ala Val Ala Gly Gly Val Arg Gly Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala
20 25 30

Gly Gln Arg Asp Tyr Asp Leu Leu Val Val Gly Gly Gly Ser Gly Gly
35 40 45

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Gln Leu Gly Arg Lys Val Ala Val
50 55 60

Val Asp Tyr Val Glu Pro Ser Pro Gln Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly
65 70 75 80

Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met His Gln
85 90 95

Ala Ala Leu Leu Gly Gly Leu Ile Gln Asp Ala Pro Asn Tyr Gly Trp
100 105 110

Glu Val Ala Gln Pro Val Pro His Asp Trp Arg Lys Met Ala Glu Ala



115 120 125
Val Gln Asn His Val Lys Ser Leu Asn Trp Gly His Arg Val Gln Leu
130 135 140
Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn Ile Lys Ala Ser Phe Val Asp
145 150 155 160
Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys Gly Gly Lys Glu Ile Leu Leu
165 170 175
Ser Ala Asp His Ile Ile Ile Ala Thr Gly Gly Arg Pro Arg Tyr Pro
180 185 190
Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr Gly Ile Thr Ser Asp Asp Ile
195 200 205
Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly Ala Ser
210 215 220
Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe Leu Thr Gly Ile Gly Leu Asp
225 230 235 240
Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro Leu Arg Gly Phe Asp Gln Gln
245 250 255
Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met Ala Ser His Gly Thr Arg Phe
260 265 270
Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val Arg Arg Leu Pro Asp Gly Gln
275 280 285
Leu Gln Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr Thr Gly Lys Glu Asp Thr Gly
290 295 300
Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile Gly Arg Val Pro Asp Thr Arg



305 310 315 320
Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val Asp Thr Ser Pro Asp Thr Gln
 325 330 335
Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala Thr Ser Val Pro His Ile Tyr
 340 345 350
Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg Pro Glu Leu Thr Pro Thr Ala
 355 360 365
Ile-Met-Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln Arg Leu Phe Gly Gly Ser Ser
 370 375 380
Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr Pro Leu
385 390 395 400
Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu Glu Glu Ala Val Ala Arg His
 405 410 415
Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His Ala His Tyr Lys Pro Leu Glu
 420 425 430
Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser Gln Cys Tyr Val Lys Met Val
 435 440 445
Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val Leu Gly Leu His Phe Leu Gly
 450 455 460
Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Leu Gly Ile Lys Cys
465 470 475 480
Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg Thr Val Gly Ile His Pro Thr
 485 490 495
Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg Ile Ser Lys Arg Ser Gly Leu



500

505

510

Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly

515

520

<210> 3

<211> 2056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (188)..(1669)

<223> tga(1664)..(1666) is transrated to selenosysteine, shown by Xaa.

<400> 3

gtcccgacc tcaggcccag ttcagtgtac ttccctctc tacttctcc ctccagtc 60

ttctccatcc ctcccttttt tggtgcccc ttgctgcct tctcgccag tagcttg 120

agtagacacg atgacacctt ttgcaggcta aaaaggctga gaggggcact atgtgcagt 180

agccacc atg gag gac caa gca ggt cag cgg gac tat gat ctc ctg gtg 229

Met Glu Asp Gln Ala Gly Gln Arg Asp Tyr Asp Leu Leu Val

1

5

10

gtc ggc ggg gga tct ggt ggc ctg gct tgt gcc aag gag gcc gcc cag 277

Val Gly Gly Gly Ser Gly Gly Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Gln

15

20

25

30

ctg gga agg aag gtg gcc gtg gtg gac tac gtg gaa cct tct ccc caa 325

Leu Gly Arg Lys Val Ala Val Val Asp Tyr Val Glu Pro Ser Pro Gln

35

40

45

ggc acc cgg tgg ggc ctc ggc ggc acc tgc gtc aac gtg ggc tgc atc 373

Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile	
50 55 60	
ccc aag aag ctg atg cac cag gcg gca ctg ctg gga ggc ctg atc caa	421
Pro Lys Lys Leu Met His Gln Ala Ala Leu Leu Gly Gly Leu Ile Gln	
65 70 75	
gat gcc ccc aac tat ggc tgg gag gtg gcc cag ccc gtg ccg cat gac	469
Asp Ala Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Val Ala Gln Pro Val Pro His Asp	
80 85 90	
tgg agg aag atg gca gaa gct gtt caa aat cac gtg aaa tcc ttg aac	517
Trp Arg Lys Met Ala Glu Ala Val Gln Asn His Val Lys Ser Leu Asn	
95 100 105 110	
tgg ggc cac cgt gtc cag ctt cag gac aga aaa gtc aag tac ttt aac	565
Trp Gly His Arg Val Gln Leu Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn	
115 120 125	
atc aaa gcc agc ttt gtt gac gag cac acg gtt tgc ggc gtt gcc aaa	613
Ile Lys Ala Ser Phe Val Asp Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys	
130 135 140	
ggt ggg aaa gag att ctg ctg tca gcc gat cac atc atc att gct act	661
Gly Gly Lys Glu Ile Leu Leu Ser Ala Asp His Ile Ile Ile Ala Thr	
145 150 155	
gga ggg cgg ccg aga tac ccc acg cac atc gaa ggt gcc ttg gaa tat	709
Gly Gly Arg Pro Arg Tyr Pro Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr	
160 165 170	
gga atc aca agt gat gac atc ttc tgg ctg aag gaa tcc cct gga aaa	757
Gly Ile Thr Ser Asp Asp Ile Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys	
175 180 185 190	
acg ttg gtg gtc ggg gcc agc tat gtg gcc ctg gag tgt gct ggc ttc	805

Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe	
195	200 205
ctc acc ggg att ggg ctg gac acc acc atc atg atg cgc agc atc ccc	853
Leu Thr Gly Ile Gly Leu Asp Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro	
210	215 220
ctc cgc ggc ttc gac cag caa atg tcc tcc atg gtc ata gag cac atg	901
Leu Arg Gly Phe Asp Gln Gln Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met	
225	230 235
gca tct cat ggc acc cgg ttc ctg agg ggc tgt gcc ccc tcg cgg gtc	949
Ala Ser His Gly Thr Arg Phe Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val	
240	245 250
agg agg ctc cct gat ggc cag ctg cag gtc acc tgg gag gac agc acc	997
Arg Arg Leu Pro Asp Gly Gln Leu Gln Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr	
255	260 265 270
acc ggc aag gag gac acg ggc acc ttt gac acc gtc ctg tgg gcc ata	1045
Thr Gly Lys Glu Asp Thr Gly Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile	
275	280 285
ggt cga gtc cca gac acc aga agt ctg aat ttg gag aag gct ggg gta	1093
Gly Arg Val Pro Asp Thr Arg Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val	
290	295 300
gat act agc ccc gac act cag aag atc ctg gtg gac tcc cgg gaa gcc	1141
Asp Thr Ser Pro Asp Thr Gln Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala	
305	310 315
acc tct gtg ccc cac atc tac gcc att ggt gac gtg gtg gag ggg cgg	1189
Thr Ser Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg	
320	325 330
cct gag ctg aca ccc aca gcg atc atg gcc ggg agg ctc ctg gtg cag	1237

Pro Glu Leu Thr Pro Thr Ala Ile Met Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln	
335	350
cgg ctc ttc ggc ggg tcc tca gat ctg atg gac tac gac aat gtt ccc	1285
Arg Leu Phe Gly Gly Ser Ser Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro	
355	365
acg acc gtc ttc acc cca ctg gag tat ggc tgt gtg ggg ctg tcc gag	1333
Thr Thr Val Phe Thr Pro Leu Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu	
370	380
gag gag gca gtg gct cgc cac ggg cag gag cat gtt gag gtc tat cac	1381
Glu Glu Ala Val Ala Arg His Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His	
385	395
gcc cat tat aaa cca ctg gag ttc acg gtg gct gga cga gat gca tcc	1429
Ala His Tyr Lys Pro Leu Glu Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser	
400	410
cag tgt tat gta aag atg gtg tgc ctg agg gag ccc cca cag ctg gtg	1477
Gln Cys Tyr Val Lys Met Val Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val	
415	430
ctg ggc ctg cat ttc ctt ggc ccc aac gca ggc gaa gtt act caa gga	1525
Leu Gly Leu His Phe Leu Gly Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly	
435	445
ttt gct ctg ggg atc aag tgt ggg gct tcc tat gcg cag gtg atg cgg	1573
Phe Ala Leu Gly Ile Lys Cys Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg	
450	460
acc gtg ggt atc cat ccc aca tgc tct gag gag gta gtc aag ctg cgc	1621
Thr Val Gly Ile His Pro Thr Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg	
465	475
atc tcc aag cgc tca ggc ctg gac ccc acg gtg aca ggc tgc tga ggg	1669



Ile Ser Lys Arg Ser Gly Leu Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly
 480 485 490

taagcgcacat ccctgcaggc cagggcacac ggtgcgcccg ccgccagctc ctcggaggcc 1729
 agacccagga tggctgcagg ccaggtttgg ggggcctcaa ccctctcctg gagcgctgt 1789
 gagatggtca gcgtggagcg caagtgttg acgggtggcc cgtgtgcccc acagggatgg 1849
 ctcaggggac tgtccacctc acccctgcac ctttcagcct ttgccgccgg gcaccccccc 1909
 caggtcctg gtgccgatg atgacgacct ggggtgaaac ctaccctgtg ggcacccatg 1969
 tccgagcccc ctggcatttc tgcaatgcaa ataaagaggg tactttttct gaagtgtgta 2029
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2056

<210> 4

<211> 492

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Xaa(493) means selenosysteine.

<400> 4

Met Glu Asp Gln Ala Gly Gln Arg Asp Tyr Asp Leu Leu Val Val Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Gln Leu Gly
 20 25 30

Arg Lys Val Ala Val Val Asp Tyr Val Glu Pro Ser Pro Gln Gly Thr
 35 40 45

Arg Trp Gly Leu Gly Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys
 50 55 60

Lys Leu Met His Gln Ala Ala Leu Leu Gly Gly Leu Ile Gln Asp Ala
65 70 75 80

Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Val Ala Gln Pro Val Pro His Asp Trp Arg
85 90 95

Lys Met Ala Glu Ala Val Gln Asn His Val Lys Ser Leu Asn Trp Gly
100 105 110

His Arg Val Gln Leu Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn Ile Lys
115 120 125

Ala Ser Phe Val Asp Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys Gly Gly
130 135 140

Lys Glu Ile Leu Leu Ser Ala Asp His Ile Ile Ile Ala Thr Gly Gly
145 150 155 160

Arg Pro Arg Tyr Pro Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr Gly Ile
165 170 175

Thr Ser Asp Asp Ile Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys Thr Leu
180 185 190

Val Val Gly Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe Leu Thr
195 200 205

Gly Ile Gly Leu Asp Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro Leu Arg
210 215 220

Gly Phe Asp Gln Gln Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met Ala Ser
225 230 235 240

His Gly Thr Arg Phe Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val Arg Arg
245 250 255

Leu Pro Asp Gly Gln Leu Gln Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr Thr Gly
260 265 270

Lys Glu Asp Thr Gly Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile Gly Arg
275 280 285

Val Pro Asp Thr Arg Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val Asp Thr
290 295 300

Ser Pro Asp Thr Gln Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala Thr Ser
305 310 315 320

Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg Pro Glu
325 330 335

Leu Thr Pro Thr Ala Ile Met Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln Arg Leu
340 345 350

Phe Gly Gly Ser Ser Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro Thr Thr
355 360 365

Val Phe Thr Pro Leu Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu Glu Glu
370 375 380

Ala Val Ala Arg His Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His Ala His
385 390 395 400

Tyr Lys Pro Leu Glu Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser Gln Cys
405 410 415

Tyr Val Lys Met Val Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val Leu Gly
420 425 430

Leu His Phe Leu Gly Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala
435 440 445

Leu Gly Ile Lys Cys Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg Thr Val
450 455 460

Gly Ile His Pro Thr Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg Ile Ser
465 470 475 480

Lys Arg Ser Gly Leu Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly
485 490

<210> 5

<211> 130

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

tcagcctttg ccgccgggca cccccccag gctcctgggtg ccggatgatg acgacctggg 60

tggaaccta ccctgtgggc acccatgtcc gagccccctg gcatttctgc aatgcaaata 120

aagagggtac

130

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 6

gcgggatcca tgacttttaa cagttttgaa gg

32



<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 7

gcgctcgagc tactatagag ttagattaag ac

32

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 8

tatgatctcc tggtagtc

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 9

gtcatcactt gtgattcc

18

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 10

acagcttctg ccatcttcct c

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 11

agaaggttcc acgtagtcca c

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 12

ccatacgatg ttccagatta c

21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 13

acgatggcgg caatggcgt g

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 14

accatggagg accaagcagg t

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 15

ttaccctcag cagcctgtca c

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 16

gcgccatccc tgcaggccag g

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 17

cacacttcag aaaaagtacc c

21

<210> 18

<211> 103

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

atggcggcaa tggcgggtggc gctgcgggga ttaggagggc gcttcgggtg gcggacgcag 60

gccgtggcgg gcgggggtgcg gggcgcgggc cggggcgcag cag

103

<210> 19

<211> 200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

gtcccgacc tcaggcccag ttcagtgtac ttccctctc tacttctcc ctccagtecc 60
ttctccatcc ctcccttttt tggtgcccc ttgcctgcct tctcgccag tagcttgag 120
agtagacacg atgacacctt ttgcaggcta aaaaggctga gagggcact atgtgcagt 180
agccaccatg gaggaccaag 200

<210> 20

<211> 69

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

caggtcagcg ggactatgat ctctggtgg tggcggggg atctggtggc ctggttggtg 60
ccaaggagg 69

<210> 21

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

ccgccagct gggaaggaag gtgtggtgg tggactacgt ggaaccttct cccaag 57

<210> 22

<211> 145

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

gcacccggtg gggcctcggc ggcacctgcg tcaacgtggg ctgcatcccc aagaagctga 60

tgcaccaggc ggcactgctg ggaggcctga tccaagatgc cccaactat ggctgggagg 120

tggcccagcc cgtgccgcat gactg 145

<210> 23

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

gaggaagatg gcagaagctg ttcaaaatca cgtgaaatcc ttgaactggg gccaccgtgt 60

ccagcttcag gacag 75

<210> 24

<211> 79

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

aaaagtcaag tactttaaca tcaaagccag ctttgttgac gagcacacgg ttgcggcgt 60

tgccaaaggt gggaaagag 79

<210> 25

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

attctgtgt cagccgatca catcatcatt gctactggag ggcgccgag atacccacg 60

cac

63

<210> 26

<211> 71

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

atcgaaggtg ccttgaata tggaatcaca agtgaatgaca tcttctggct gaaggaatcc 60

cctggaaaaa c

71

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

gttggtggtc gggccagct

20

<210> 28

<211> 92

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

atgtggccct ggagtgtgt ggttcctca ccgggattgg gctggacacc accatcatga 60



tgcgagcat cccctccgc ggcttcgacc ag

92

<210> 29

<211> 175

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

caaatgtcct ccatggtcac agagcacatg gcatctcatg gcacccggtt cctgaggggc 60

tgtccccct cgcgggtcag gaggtccct gatggccagc tgcaggtcac ctgggaggac 120

agcaccaccg gcaaggagga cacgggcacc ttgacaccg tctgtgggc catag 175

<210> 30

<211> 137

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

gtcgagtccc agacaccaga agtctgaatt tggagaaggc tgggtagat actagccccg 60

acactcagaa gatcctggtg gactcccggg aagccacctc tgtccccac atctacgcca 120

ttggtgacgt ggtggag

137

<210> 31

<211> 96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

ggcgccctg agctgacacc cacagcgatc atggccggga ggctcctggt gcagcggctc 60



ttcggcgggt cctcagatct gatggactac gacaat 96

<210> 32

<211> 93

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

gttcccacga cegtettcac cccactggag tatggctgtg tggggctgtc cgaggaggag 60

gcagtggctc gccacgggca ggagcatgtt gag 93

<210> 33

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

gtctatcacg cccattataa accactggag ttcacggtgg ctggacgaga tgcattcccag 60

tgttatgtaa ag 72

<210> 34

<211> 98

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

atggtgtgcc tgaggagacc cccacagctg gtgctgggcc tgcatttcct tggccccaac 60

gcaggcgaag ttactcaagg atttgctctg gggatcaa 98

<210> 35
<211> 195
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35
gtgtggggct tcctatgcgc aggtgatgcg gaccgtgggt atccatccca catgctctga 60
ggaggtagtc aagctgcgca tctccaagcg ctcaggcctg gacccacagg tgacaggctg 120
ctgagggtaa gcgccatccc tgcaggccag ggcacacggt gcgcccgcg ccagctcttc 180
ggaggccaga cccag 195

<210> 36
<211> 290
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 36
gatggctgca ggccaggttt ggggggcctc aaccctctcc tggagcgcct gtgagatggt 60
cagcgtggag cgcaagtgtt ggacgggtgg cccgtgtgcc ccacagggat ggctcagggg 120
actgtccacc tcacccctgc acctttcagc ctttgccgcc gggcaccccc cccaggctcc 180
tggtgccgga tgatgacgac ctgggtggaa acctaccctg tgggcacca tgtccgagcc 240
ccctggcatt tctgcaatgc aaataaagag ggtacttttt ctgaagtgtg 290

<210> 37
<211> 66566
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

atggcggcaa tggcgggtggc gctgcgggga ttaggagggc gcttccggtg gcggacgcag	60
gccgtggcgg gcgggggtgcg gggcgcgggc cggggcgag caggtaggat ggggtcgggg	120
cgtccccgcg gtaggtgtcc gcgcggccgg ggtgtcctcg tgagggtgtc cgcgcggcgg	180
tggccagggt gtccccgtgg ggggtgccac gcgggggtgt ccacataccg gcctcttggt	240
ctagtcttgc tcaggagtcc gggtgtcttc tagccacaag tagccccctt cccagggtggg	300
gaaactgggg ctgggtgcct tgtctaaggt cctgtgtgc tgactgcacc tgttgtctcc	360
cagagctggt atcccagtaa caactacagt tctgaagatg atgatatccc acctcccgag	420
gtcaccaggc accggcccca ctggccagac ttcccaactt ctcccagac ccttagactc	480
tagaggttag aggctgcaca gagcaatggg aggatacaca ctctctctcc tggagcccct	540
gaagaacagt taactaaatc aggacaataa tcataactga gcactcgaag cagaggctgg	600
gtgtctggtc actcaggaca gttcaagcct cctctgtag gacagactcc cctagatccg	660
accagagcgc caccatatct gttatgtgtg gccagtttca ttccatgcac gacaacatgg	720
tccccacca tgcagggggc cctcgaccc agccccctgg atgcttgtga cagcgagcag	780
ctctccccac aggcagtgag ttagagggg tgtaaggacg gggtcagggc tccttcccag	840
ggatggcggc tatgggaggc atggtggctg gccctctgcc cgcggtggac tcgggaggga	900
gggtgactg tgtgtgtgaa tgggcagagt tgggtctatg gaggttttgg gggctctccag	960
gacggagggt ggcccaacag agttctggga ggcagtcacc acctcgtggc cttgtctgaga	1020

cctggaaccc tcagccaggg cactccatct ttcaaagctt cttggctgca tgcgtcaggt 1080
gggcaagctc aggaaggta aatgcacccg tgctggcgga gtcccataaa aggggattcg 1140
gcatcaaaag gaggaaaaag gttcaaaggg catttatcat ggggttcaga atcacggatg 1200
tgaggggagg tagtggggac aacagacaga aaagcttccc cttcccatac tcacagtcca 1260
gacacggcaa tagccaaatt ccaaatttct aggtattctg gactcagaat ggggaatata 1320
atacagact tagggggata atgcccttat cttcctattt taagggaag aacaaactga 1380
acctctatg caaaatagga tgatgacct ggtcctcca gtaagaaata aaataagtag 1440
tctccaggca ttcttttccg ccagaggagc aactgttttt taaatagccc ttctgtccc 1500
agtctgttac taaaccatat gagttgtttt ttggggttt ttttttttt ttttttttg 1560
agacagtgc ttgctctgc gcccaagctg gactacagtg gtgcgatctc agctcactgc 1620
aagctccgcc tcccgggttc acgccattct cctgcctcag cctcccagat agctgggact 1680
acaggcatct gccaccacgc ctggctaatt tttttgtat ttttagtaga gacgggattt 1740
cactgtatta gccaggatgg tctcaatctc ctgacctcat gatccacctg ccttggectc 1800
ccaaagtgt gggattacag gcatgagcca ctgcgccag ccgagtcatt ttttaatact 1860
actgcatgtg agttaacaca atcattccca aattgaagtt ttagatgggc cctcaaaatt 1920
tttaggatat ggttttcta caggtttata ttgaaagtat ggggtatctc ctattactcc 1980
tctttttatt tgtcttaaag gagaaaggga gaggccagag accaaatgtc cccatttccc 2040
tatagctaata ctctctggaa gacaagcagc ccagacttga gcttctagat ggatacaacc 2100

aggtgcatgt ccaaggcaca gaggagggtta ttataaccc atagtaacat taaatgcagt 2160
gccttctcct ggctgagcgg tgcaacggtc atctgtagtt ccaggcaccc acacactatc 2220
gttagtatag atttctgcag gagcatccat ccagggtgaga ggtcgaataa gtggaggaaa 2280
aggcacataa gcccaataag aataattttg ttagcaggt aaatcagttt aaggggaaac 2340
tggtgagaca gaaagtgtta ggaagataat tattaaataa aacctattgt aagtgagatc 2400
cagtgtgaa ggaggaagag aagaacagag ggatgttatt ttcaggctaa tagaaatggt 2460
gagattttta ggttcgtaag gagaaaaaga taattaggag aagtgggatt agttagaggg 2520
gtttacattg ccattaggga ggattgaacc agaccattt tgatttgca tgccagtttc 2580
tgaggagtcg gtacagatct catcaggtat gagggcagtc tctgacgca acgtctcttc 2640
ctcgtggttt ttattgtcag tattcacacg aagtttaagt ctctagtgg gcaccagac 2700
gggattgacg atctcctggt aaaacacaag catacctct tccccagtt ataattgttc 2760
caggttccca ggtattggtt tgggagtttt tccatgacac tggttgccct tegttaggg 2820
agaatttttt gcctgtataa tggcatttag ctgcagtcag agtattgttt ttaggaacat 2880
ttagaaaagct taaacaatgc taaatataat tgggagtggg gagtagttaa attatgcttt 2940
taaaccagcc ttgtcttctt ttacagtaac ttgaagaggt ttagtaattt tttcacgttt 3000
tggaaccgaga ccgagtcctg aaacaaaccc catgttttcc attatatgtt gactgggagc 3060
actgtaaaag ttatgtggaa tattaatttc agccccaatt tgtgccagca aatctctgcc 3120
ccgaagatta atggggatgg gcatgatata aggctgaatt gttccctttt gaccatcagg 3180

gccagtgtcaa gccaaagataa atgtgctctg gtgaacttct tcagcttttc taacaccttc 3240
tagtttcatg ttagtgggat gttaaagcca ggaggaaggc cataaattag aggaaataat 3300
agaaacatca gccccagtat caactaggcc ctcaaccttt tttccttgaa tgtgtatggt 3360
gcaggtaggc cattgttttag aaattacatt aatccaataa gcggtttttt caccgttga 3420
gccccatcca gggcccatg tcttatctcc ttgttttaa acaatgttag gtagtaaaag 3480
taattgagca attgactcac tgcccggaat ggaaacagga actttggcag acaccataag 3540
tttacataag tttaatctca tcagaggaat cagaattaat gagactagta tgaactatga 3600
tacctttagt atcatgaggt ggatgccctg cctaacacca gggccaccga accttgaggt 3660
aaagggccag tgacccccat ggggacaatt aaaggcaaag aattaggtag taaatttaga 3720
ggaatggtac tacagagatc gaccgccctg ctgcctactg tggaggtaga caagcattgt 3780
actgagacag aagaagaggc tgggacccat ctggattggc ttaggtaaa tttttttgtg 3840
ctgggggctg cgttgggact gcttgacgca aaaacacaac attggtctga gtccgaggtg 3900
tcccatttga tattggggcc tgggactggc cttgcttctt gtttcctgg ttctgtggca 3960
agggattttc atctatatca gactgagtgg caagtacttg cccaatgttt acccttacga 4020
caacgcaggc aaacagtagc aggagcattt ggccgtgttt gttgagccgg cttggccgct 4080
tttaagtttt taacagtgtg gtttttttgg gtatgaccaa gttggccaca attatagcag 4140
gtccaagaa aagaatcagt cgagccagtt tgggtgccgt gttcatggc cgggtcccac 4200
agaatagctc tgtgggtctc cgatccaacg cttcacaag ctttaatatata tgcaggcaac 4260



acctcatgat caggtaaatt ttgacgtagg atggaatgca cggccatitt acactcatgg 4320
ttcgcatitt gaaaagctaa catatgaaga agaatacctt gagtgtgctc atcagagaca 4380
gatttttcaa cagcatcttg taatttagct aaaaaatcaa gatataattc attgtgaccc 4440
tgtttaacaa tagtaaaaga aacagaagct tggcctgggg tgcgtaattt atcccaagct 4500
ctcatacaca cttttgttac ttgttccgtg gtgagagcat caaagcctaa atgagcagta 4560
gtatcagagt aattatcgga gcctgtgagc tgagcctgag taattggaat gccatcagcc 4620
cgatttagct gagcctgcag gcgggcctcc tctgaccacc aggtatggaa ttgtaaattc 4680
tgagatggag ttagaacagc ttttgccaaa aggtcgcagt ctataggaag caaaatgacc 4740
tcggtacaaa gagtctgtaa tacgttttaa catatggaga agtaggaaca tactgagtac 4800
aagcatcctt gaattctttt aaaaaggtaa gattgagcgg cgtatatcga cacacttgta 4860
ccccttgagc attaggaggt tccagcatga ccgaataagc ccacgcctct aatctacttg 4920
tttgttttgg cgtaataagc attgcatgaa agtttcaaga gcaggcacat gagatagagt 4980
cggcatagaa gtgacaggaa aagtatgtat agataagaga aactgagatt gacggggctc 5040
gactggtata agagtgtgag aaaggggcat tgggggagca gaagaggcag aagcacttg 5100
gtgattactg gccagtcct gcacaaccag agtggcaggg gtgtccctgc atgaagaagg 5160
gtacagagaa gcaggttgag tggatggcaa agtgaccggt tgagggacca aaatgatagg 5220
agggtgaggg gctgtggtgg atgggggagg gcctgcagaa ttacaggtaa attgtagttt 5280
ggatggctcc ggaggcaaag actgtaaagg tttggagagg gaagagttag catagatatg 5340



4.

5.

6.

7.

gtcctgggct gtctgagttg gggccgcagg agctacaagt gtcggctctt cgtgaaaaga 5400
aataagatca tcagggggtg atgttaagcc aaagtcactg gagttagata ttgaatcctc 5460
agtatcgtca ggtgggggag gagtaggcaa agggaggggc tgagcagata atgaaggccg 5520
agtgggagag gaaagctgag gaagaggtag agggtaggcca gattcagaaa actgtggtaa 5580
ctgcagggtg tcacgggatt ggtatgtcat taggatggca cgtaccaagg cccaatcacc 5640
ccaaacagtg acaggaacat aatttcctgt tgggaccagt tctcggaatt ttgcaccaac 5700
atgatcccat agttccacat ctaacgttcc cttttcagga aaccaaggac agtgtttctc 5760
cactgccctg aataggggtga ccatattttc catgggaacc cgaactcccc cattttaaca 5820
ggaatttaat atagcagaga taagcataat gtttagactc tgcgtgaccc atagttaccc 5880
cggagaatac acagacaact caccaatcgt tggggagcca aacaagcatt tctgtggact 5940
ggaccgatga acattttctc gcacctacca aagggaatcg ggttcccaca tgcacttagg 6000
aaaaagaaaa ccacgttggg cgccagatat tgggggaacc tgcccctaatt atttcaacgt 6060
acgttc'ttctc tattttctgt aagtgtcagc cggtgagaa atgaagagaa agagtacaaa 6120
gaggaatttt acagctgggc tgctgggggt gacatcacgt atcggtagga ccatgatgcc 6180
cacctgagcc gcaaaaccag caagttttta ttaaggattt taaaagggga ggggttgtgc 6240
caataggag taggtcacia agatcacatg cttcaaaggg caaaaggcag agcaaagatc 6300
acatgcttct gaggaacag gacaaggca aaatcagaac tcttgataag ggtctatgtt 6360
cagctgtgca catattgtct tgataaacat cttaacaac ggaaaacatg gtttaagagc 6420

agagaaccag tctgaccaca aatttaccag gacggagttt tttcccacc ctaataagcc 6480
tgagggtact gcaggagacc agggcgattt tcagtcctta tctcaaccgc ataagacaga 6540
cactcccaga gtggccgttt acagacctcc cccaggaat gcattccttt tccagggtct 6600
taatagtaat attccttgct aggaaaagaa tttagcgata tctctcctac ttgcacgtcc 6660
atttataagc tctctgcaag aagaaaaata tggtcttttt tgctgaccc cacaggcagt 6720
cagaccttat ggttgtcttc gtccctaaa aatcactgtt attctgttct ttttcaaggt 6780
gcgctgattt catattgttc aaacacacgt tttacaatca attctacag ttaacacaat 6840
tatcacagtg gtctgaggt gatgtatatt atcagcttat gaagataaca ggattaagag 6900
ataaagacag gcataagaaa ttataaaagt attacttggg ggcccaggcg cgggtggtca 6960
tgctgtaat cctagcactt tgagaggccg aggcagccat atcacaaggt gaggagatca 7020
agaccatcct ggctaacatg gtgaaacct gtctctctg aaagtacaaa aaattagcca 7080
ggtgtggtgg cgggtgctg tagtcccagc tactcaggag gctgagacag gagaatggtg 7140
tgaaccagg aggcggagct tgcagtgagc tgagattgtg cactgcacc ccagcctggg 7200
cgacagagag agaatctgcc tcaaaaaaaaa aaaaaagaaa aaagtataaa agtattactt 7260
gggaattgat aaatgttcat attgaaatga aatcttact atttatgttc ctctgccacg 7320
gtccagcca gtccctccat tgggggttcc tgacttctg caacacaggt gtgagccact 7380
gtaccagac taggggtgca gttttttttt ttttttttt ctgagacaga gtctcactct 7440
gttaaccagg ctggagtga gtggtgctat catagctcac tgcagccttg aactcctggg 7500

ttcaactcac cctccagcct cagcctccct agtagctggg actgtgggcc ctgcagtttc 7560
tccttttaga gtaggaagac ctgaactgtc ccagccttgg agtgggtggg cgatgcagcc 7620
cctgaacagg agccagaatg acaacacctg ctgccaggaa agagctctag atagagcagc 7680
catacaggag ggccccctgag gtggcaccct gaggtggcca gcctgcctgt ggggtgcacat 7740
tttgggggac cttccactt gccctcactg gtgcagtgtc gcattctctt gggccttgct 7800
atgagctctg ggctcctgtc ctttgcctggc ctgtaccagg cagtgggttc aaagaggagc 7860
agaaaattaa tggacaatat gtcagaaggc agaggcaaga cagacacttg ctggggccaa 7920
gccctgcagg tggagagggt atgcctggct aaagtgggtg aaaggcaagg ttatgaggtt 7980
ctccaggaca ctggagtga caggtggtgt gtccccaggc aacgcctgcc acccagccct 8040
tcctcccaca gaacagcacc tgcctaccc accttgagg tactttgggg tccttccttc 8100
ccagcaggct acccaagccc ttccaagtgc ttaaaggcag atttcctatg cttgcaaacg 8160
actgcctat gccagtgttt atcagccga gagggctcct ggggtgtcac agggggcgag 8220
caagctgccc aagataagca catccataca gacagctgtc caccctgcct gatagcagac 8280
agagggggca cagtgcgagg ctgcaggga gcatgacct acaagggcc tgctatggca 8340
acaagaagga caggcacctg ccatggaagg tagggacgtt ctgagcaaag cttccggcta 8400
ccaggcagct ggaggagaga gatgttctc catcagcagg ttcattgtcc ccgggggacc 8460
tggtggcatt ttctccctga ccagcagtc ttggttctc agacttatat taaagccatt 8520
agaataattt acaacaattt aggcctttcc agagcccttg agttgaatta ggaattgagt 8580

gtgctttgga ctggctgttg gaaccgagtt gtggctctgt cagttcccgc aggtgcgcac 8640
acatctcacg tgcactcaga ggctggctgc caggtgaaag agtgggtggg tttggttgtg 8700
gggcaggctc gctgcaggcc atggcctgag tgcctggatg cagcttccca agctttctca 8760
gctgtgagcc agggctcctc taggtccag ctcttgatc cttaggagt gcatgttcta 8820
gacctgtctg tggggcatct gcagggccag ggtgtggaga gacatgacac tccaagtaca 8880
ctctctgcag ccttgctgc ctaggaaggt ggaggtggct gcaaagataa gtgcagcctt 8940
ctcatggcag acgctaggct ctgatggagg tgttgggcag gttgccagc cttgtatgac 9000
agaccctgct ctgatcatgg aacctcttgg ccttgtctga agcagcgacc ggctccagat 9060
gctctgggag ggtggtgctt ctcatctggg caggctcgtg tctgcagagg ggctgagggc 9120
actacttgtt ttataccta gactctgtc atcagtcacc accctgccct caccacagca 9180
gactgatgac ttgtattat ttcttcttc cttcagcagg gacttggtg gtgcctgggtg 9240
ctgggtgtcc cggacctcag gccagttca gtgtacttcc cctctctact tctccctcc 9300
agtccttct ccatccctcc cttttttggc tgcccttgc ctgccttct cgccagtagc 9360
ttgcagagta gacacgatga caccttttgc aggctaaaaa ggctgagagt ggcactatgt 9420
gcagtgagcc accatggagg accaaggtga ggcgacacca caaccagccc aaaaggaatt 9480
ccagggatga aacctgagcc caggcagctc tccctgtgcc cagggtggct tccctcctag 9540
ctgactgcag ctgggcacac caagacctg gctgtgtgca ctggccagct gtgagggaca 9600
ggggtgctt gtgcttttat tctttttttt tttttttttt ttgagacgga gtctcactct 9660

gtctcccagg ctggagtga gtggcgtggt atccgctcac tgcaagctcc gcctcccggg 9720
ttcacgcat tctcctgcct cagcctcccg agtagctggg actacaggcg cccaccacca 9780
tgcccggcta attttttgt attttttagta gagacggggt ttcactgtgt tagccaggat 9840
ggtctcgatc tcctaacctt gtgatccacc cgccttgccc tccaaaagtg ctgggattac 9900
aggcgtgagc taccgcccct agcctgtgct tttattcttg ctcacttggt acggagggca 9960
gccttcacaa ctgaaaggca cgtggacttg agaattgttt agtccacctt ggtggctcat 10020
gcttgtaatt ctagcacctt gggaggccaa ggtggaagga ttgcttgagg ccagggtgtt 10080
gagaccagcc tgggcaacat agccagaccc catctctaca aaacaaaaaa atttagctgg 10140
acgtggtgat cgggtcttgt agtcccagct attctggagg ctgaggctag aggatcactt 10200
gagcccaaga ggtagaggct gcagtgagct gtgattgtgc cactgtgccc ctgtcgtggg 10260
ggcccttccg ggtctatgtc ccagccctgt gctgaccgtg ttccttctca cctttcatcc 10320
ctcccccaag cagggcagtg gactacaatc ttctgggtga cagagtgaga tcctgtctca 10380
aaaataaata gaataaaaaa gaaaatatct tagttctgtg tctggctgag aacactgggt 10440
gaggtttgag ttacagatgg ttggtatggt gtgcgtgtga ttttgcaaag atgatcacac 10500
acgcccacgg ccaacctcac caccatatgg cttggtctct ggatttgac agactatgtg 10560
tatcgagtca ctctttctgc tctgttgtgt ggtgtcttgt caccctgac catcacagaa 10620
tggagtgtcc aatcctgata aaattgatcc tgtaccaggt ttaaccagac agacagtccg 10680
tcccacctct catcccttct ctcagcaggt cagcgggact atgatctcct ggtggtcggc 10740

gggggatctg gtggcctggc ttgtgccaag gagggatatgt attctgtata ctctgtggca 10800
aggcctcgaa gcttttaggg cccctagaga ggggtgtgct gtccagaaaa cgtccatgag 10860
caaaatgcgt tgcctccctg ctggggtcac cccagtggcc tctgtgttgt ggcttgttcc 10920
ctgccactct ccagctgtct gctgtaccca gcggccgccg tggcacttca tggctgaact 10980
gccttctca gtccagccc tccagctctt ctgctttact cacagtgaca gcccgaatcc 11040
gactagtctc agtcccacc actcacacc tccgtgggct cccacttct cttcacgtgc 11100
ttctggacag tctctctctt cacttactg tggctgtcac cctgcctgcc tgcctctgc 11160
ccctgcccg ctagctgca ggctggagct gcacctcct gcttgtccct gtccttcttc 11220
ttagtgctgg tgccttccc cagggtccat ggtcagttct gctgggtgag tcttgactt 11280
ggcctggcac ccattgagta aagatgttgg gcgaacgggc tggaccaga ggtgtccaga 11340
gatgacactt tgcagttctc tgctaacca cgtgatgcac aggccaccag cactttgcca 11400
gactctgtgc cctgctgtag gatttctgg tctgctctgg ccatgtctac acaatgataa 11460
gagggcagtt gtggtgaatg gggaggggaag gggatgagag ggaggtgggg ctgaaatgag 11520
agggagttaa ctgggcactt tggccctgaa gctgtgcttc tctgatgtcc agtattgggc 11580
tctagaagca tacatggtgt aaaagaaatc cactactctt gctctgtggg ggccggggag 11640
tgtgtaggaa cctgggaagt ctcttggcct attggggatc cgcagaggca cccaggatca 11700
gtccacact gtactctcag aaccactccc agaaacgatg gcgcaggcag ccacagggcc 11760
tagtgctgtt ctttttagca gaccgggcac ctgggctgtg cgttcactcc catgctggga 11820



gtgaccagct gcagagacct gagtccccctt taatccggaa tgtggacagc tcctgggtat 11880
gtctccgcct ttcattgagag tggcatttcc ctgcagagga tgacgtggtt ttgtggcttt 11940
tttgagatga actgtacctt tcaaaatggg caacctgac attcttatgt gtgcatgtgt 12000
ccatgcagcc agtaccgcag tcaagattgg cgagtgtgc ctccaccccg ttagctgccc 12060
agggctgccg taataaacag actgccataa cagactgggc ggctgaaaca acacatgctt 12120
attgtctctc agttctggag gctagaaatc atccaggtgc gggcagggtt gatttcttct 12180
gaggctctc cgttgggctg tagatggcag ttgtcgtccc tctgtcatg tctatgtcct 12240
aatctctacc tgtacctgc ctaatggatc aggtggatgc cctcttattt tgttggcttt 12300
ttattggaga cagggtcttg ttctgcctcc caggctggag tgcagtggcg tgatctcagc 12360
tcactgcaac ctcaaactcc tgggttcaag ccactctctt gccttagcct cccaaaatgc 12420
tattacaagt gtggccactg tacctgtata tggcctaatt tttttttttt tttttttgag 12480
atggagtctc gctctgttc ccaggctgga gtgcagtgtt gtgatctcag ctactgcaa 12540
cctctgcctc ccgggttcac gccattctcc tgtctcagcc tcccgagtag ctgggactac 12600
aggcgcacac caccacgccc ggctaatttt ttttattttt agtagagacg gggtttctact 12660
gtgttaacca ggatgtctc aatctctga cctcatgac caccacctc ggcctcccaa 12720
agtgtggga ttacaggcgt gagccaccgc gcccgcccta tggcctcatt ttaacttaac 12780
tacctctttt ttttttttgc aagcgagtct tgctttgtca cccaggctgg agtgcagtgg 12840
tgagatcttg gctcactgca acctgtgcct tctgggttca agcgattctc ctgccacagc 12900

ctcctgagta gctaggatta caggcgccctg ccaccacacc tggctaattt ttgtatttta 12960
gtagagacgg ggtttcacca tgtttgtcaa gctggctctg aacttctggc ctcaagggat 13020
ccgcctgcct cggcctccca aagttctggg attacaggca tgagtcaccg tgtccagcca 13080
acttaattac ctttttgaag accctatctc taaatacagt cacattctga agtgctaggg 13140
tttagggctt ccacataggg attttgaggg gatatggctc agcccataac accccaacat 13200
tttctgaaac cttggcagtt ccttcggct tccccactt ctgcatecta ggcaaccagg 13260
catgtgctgt ctgtcactat agtttgcat tctataatt gcgtataaac ggaatgctgc 13320
tgtatgtcat cttcctcttc tggcttcttt cactcagggt aatgacctg agactcatct 13380
tcgttggcgc gagtgtcgat ggtttcttgc ttttcattgc tgagtagtgt tctgtttatg 13440
gctgtgccgt ttcgtgtacg tgttccctg tagctggaca ctggaattgt ttccaccttt 13500
tgccattgt ggacagtatt gctgtgaacg tctgtctgtg tgtttgtgtg gatatatgtt 13560
ttaaattatt ttgggtaagt gcctaaaaat ggaccaactg gatcgtgtgg tatatctctt 13620
atttaggtat ttttcattt cttttagcag cattttgtag tttctttttt actcaagttt 13680
tttttttta ttaaaaaaaa gaaagatgag ggtctctctg tgttgccag gctggtctca 13740
aaatcctggg ctcaaatgat cctccacct tggcctccca aaacgttggg attacaggaa 13800
tgagccacgg tgccctggcct gtggttttca atgtctacgt ctttcacata ttttatcaga 13860
tacatcccta agtgtttcat atttttagaa tagttttatt gagatatacc tcacattacg 13920
tatgcatttg tcccttggtc cccgaggacg actgggttca ggaactcccg ctgttagcag 13980

aatccatgga cactgaaatt tgtgcatact ggagtcaggc agttggccct gaagcaccca 14040
cagatacaga gtcagccctc tgtatatata gttttgcatc ctatgaatac tgtttttttc 14100
tttttctttc ttttttttct ttctttcttt tctttttttt tttttttttt ttgagacaag 14160
gtctcatgtg ttgccaggc tgcagtaaatt ggtgcaatct cggctcactg caacctccac 14220
ctcccgggtt caagcgattt tcccacctca gcctcccagag tggetgggac cacaggcgcc 14280
accatgcccc gctacttttt gtattttttt ggtggagaag gtgggtttcg ctatgttgcc 14340
caggctggcg ttgaattcct gagctcaagt gatccgtctg cctcagcctc ccaaagtgtc 14400
ggattacagg catgagccac catgtccagt ggagtactgt attccaatc cgagtttggt 14460
tacagatttg gaacttgctg atatggagag ataatatata tatttttttg agaccgagtt 14520
tcgtctttgt caccagget ggagtgcaat ggcacaatct cagctcactg cactctccac 14580
ctctggatt caagcagtc tcttgccctca gcctcccag tagctgggat tacagggtgc 14640
tgccaccacg ccagctaat ttttgtattt ttagtagaga cggggtttca ccatgttggc 14700
caggctggtc tcgaactcct gacctcaggt gatccgccc ccttggectt ccaaagtgtt 14760
gggattacag gtgggagcca ctgtgcccg tcaagggtt atattttattg aaaaaaatc 14820
catgtatgag tggacctgtg cagttcaaac ctgtgttatt caagaacatt ttagtttctc 14880
ccaaaaatac cctgtacca ttggcagtc gtctcttccc ccctctccc agcccctggc 14940
aaccactaat ctacttccta taccgtgga tgtgtctgt ctggacattt cagctgtttt 15000
ttggttggtt ggttgtttgt ttccagacag ggtctgactc tgttgcccag gctgggggtgc 15060

agtggcacca tctcggtca ctgcaacctc ggcctctcgg gctcaagcaa ttctcccacc 15120
tcagcctccc gagtagctgg gattacaggt gtgcaccacc acatccagct aatTTTTTgt 15180
atTTTTtagta gagacggggt ttcaccatac tggccaggct ggtcttgaac tcttgacctc 15240
tcaagtgttc caccacactt ggcctcccaa agggttggga ttaacagggtg tgagccgccg 15300
ttgttttgtt ttttgagatg gagtctcgt ctgtcaccct gactggagtg cagtgggtgtg 15360
atcttggtc actgcaacct gtgcctcctg ggcctcaatg attctcctgc ctcagcctcc 15420
caagtagctg ggaccacagg cacacaccac tatacccgac taatTTTTgt acttttagta 15480
gagatggggt ttcacatgt tggccaggct ggtcttgaac tcttgacctc aggtgatccg 15540
cccacctcgg cctcccagag tgccggtatt acaggcatga gccaccgtgc ctggcctctt 15600
cgcatattct ttttcttttt ctttcttttt ttttttttt gagacggagt ttcgtcttg 15660
ttgccaggc tggagtacca tggcacaatc ttggtcacc gcaacctctg cctcccagggt 15720
tcaagcaatt ctctgcctc agcctcctga gtagctggga ttacaggcat gcaccaccac 15780
gcctggctaa tttgtattt ttagtagaga aagggtttct ccatgttgag gctggctctg 15840
aactcctgac ctcaggatgat ccaccgcct cggcctccca aagtgtggg attacaggcg 15900
tgagccacca tgcccgccc tgcaatttct tgatggtatc ctttgtgcca caaaagtttt 15960
aaatTTTgtt gaagtccaa tttatctatt ttttctttt gttgcttatg atTTTgtat 16020
catagctaag aaatccaaga tcacaaagat ttacacctgt gtttcttct aagcatttta 16080
tagttcaagc tcttacagtt aggtctttga tttattttga gttgctttag ggTTtatggc 16140

atgtacctta acttgcagct ctaccttaa aaaagcatat atctattcca cccctcctaa 16200
ccttcattct atgttattat atcatgtgtt tactgttaca tgttataaat ccatgataca 16260
tcattattat ttttgtttta aatatactta aatcgtgtga gaaaatctca catactcacc 16320
cattgtattt ctgtgctctt cattcctttg tgaggatcca catttccatc tggatatttt 16380
ctctacatt aagggcattc tttagcattt cttgtaatat ggctctgggg gtaatgaatt 16440
ctctcagctt ttgtatgtct gaaaacgtct ttattttgcc ttcttttttg ttgttgttgt 16500
tttgttttgt tttgtttttt gagatggagt cttgctctgt cgcccaggct ggagtgcagt 16560
ggtgcatct cagctcactg caagctctgc ctcccgggtt tgcgccattc tctgcctca 16620
gcctcctgag tagctgggac tacaggcgca tgccaccatg cccgtctaata ttttgtgat 16680
tttagtagaa acggggcttc gccgtgttag ccaggatggt ctgatctcc tgaccttgtg 16740
atccgcccc cttggcctcc caaagtctg ggattacagg cgtgagccac catgcctggc 16800
ccccgcttt tttttttttt ttcagtactt taaaaatttt gccctctga cttctggctt 16860
gcattgtttc cagtgaagaa tctgtacta tttttatctt agtgtctctg tagtgtgtct 16920
tggttgcctt taggattttc tcttttcatt ggccttgagt cctccttct tcccctcaca 16980
tgtggggact ttttaattcca tgtatattag gctgcatgaa gcttccccac aacctactga 17040
tgctcttttc attagaaaca tttcttactc tgcgtttcat tttggatagt ttctattcct 17100
atgttttcaa accaccaat aaaagattct gcaacatctg acctgccatt aatcccgtcc 17160
agtgtatttt tcctctcctg tattgtagt ttctctctca caatccagct tgagcctttg 17220

gttatatctt ccatgttget cctgcactgt ttgaacatgc agaattggcta gtggggcagt 17280
gagctgagga gaaggacag aggggaagct cagctgttgg gtctacgggt atgatggaga 17340
ccatgcagct gaaagtaaac cgtcacccct tctgcttcag tgtgaaaggc caggtgaaga 17400
tgctgcagct gatgaggctg ggccttaggg tgcgggggggt ggtggaatct gcttgtgggc 17460
gggagatgtg gctatgtggc tataaaggat gaagatgaac gccctgtttg cttttcagcc 17520
tcgcttgat caaggttaa aggccggtt tggccttctt ggtggaagaa agagagagat 17580
aaggcactgt cctccccctt ggagggtctg gggatacact aatccatcaa aaccactgag 17640
ggctgggcgt tgggtgtgct ctgtggtccc agcactttgg gaggtgagc tgggaggatt 17700
gcttgagccc aggaggtcaa ggcgtaagca agctgtgatc gcaccgctgc acaccagtgc 17760
ctgggcaaca aagtgagact ctgtctcttt aaaagaaaaa agaaaaaaaa gccttttttt 17820
aaattaaaaa aaaaatcaag tctacctgaa tggcctgcag ttggaccac aaaccagta 17880
cccaagttac caggcaaggc agctgcagtt gtaccagtca gaagtccaca agatttgaaa 17940
aaaaaaaaa aaaaaaaag cctcaggggt ttcagtgaat gctgtgttaa cttttttttt 18000
tgagacatag tttactctt gttgccagg cttgagtga gtggtgccat ctggctcac 18060
tgcaacctct gcctcccggg ttcaagcagt tcttctgcct cagcctcccg agtagctggg 18120
attacaggcg cccaccacca cacctggcta atttgtatt tttagtagag acgagctttc 18180
actactggtc gtgaaactac agttggctcag gctggtctcg aactcctgac ctcaggtgat 18240
ctgccgcct cggcctccca aaatgctggg attacaggcg tcagttacca cgcccagtct 18300

gcttgtaac ttctataagt cagatgtttg atgtgaccga gttcaaggct gatacagccc 18360
agagccagga caggctgaga gctgcccatt tttagggcct cagacttcct actgggagca 18420
tcgcagcccc ttctgaacag aggtttggag aagtggtgct atttgagag aagtgccta 18480
aactatccta gttgaaggaa tctatccttg aaagtcacaa ttgaaggaat tcaaaaagag 18540
aaaacttaag ggaaaggaaa aaaatagttt taaattttaa agagtgggca tgtgggagag 18600
gggttgaga tagttaagag ttataggaaa acatttccaa ttaatatgag gagaaatttt 18660
atattgggag agttccaaa attaaatggc cacttgggaa ggcaatacat tccagacaa 18720
aggcaccagg cataggtgaa cacttggtga ggatgttatg aaggagactc aaacttcagg 18780
taagcaggta gaacaaattg catataatat ccttcctggc cgggcatggt ggctcacgcc 18840
tgtaatccca gcactttggg aggccgaggt gggcggatca tgagatcagg agtttaagac 18900
cagcctgacc aacatggtga aaccccatct ctactaaaaa tacaaaaaaa ttggccgggc 18960
atggtggtgc gcacctgtaa tcccagctat tcaggaggct taggcaggag aatcgcttga 19020
accaggagg tggaggttgc agtgagccaa gatcacgcca ctgcactcca gcctgggtga 19080
cagagctaga ctccatctca aaaaaagaga aaaaaagatc ctcccacac caaaagtctg 19140
tagctgtgaa aagtagctac catatagtgc aagttgagat gcataagagg ttataaaaac 19200
cacctggag tcgaaggaga gagaactttt ggtagggagt aagtaggtaa aaagggaccc 19260
aaaggtctgg gatcttgaac actgaaggag gaacagtgtt ctgtgagaaa ggtttgtttt 19320
taacatgtta atttctcaa caaacattt gaataacttaa tgtgttccaa gctctgggcc 19380

aggaccgga acaacaaaga caaaccagga ccaaagcccc tgactgacgg agttctgcag 19440
tttagttacc gagacagaca catgaacaga tagttcatca tatgtgataa ggtggagtta 19500
gggcacacaa gtgaggcatc taagcaagga aataaaaaata aaaaagtatg gaatagttag 19560
aatacctggt ttattgatct tttctgctaa ttctgacatc tgtgtctggt ccaagtcagt 19620
ctccattgac tgattttttt ttgtcccttt tatagggtga ttttcctgct tctttgtgtg 19680
actggttaatt ttgggttgaa tgccagacac ttgaatttac cttgttgggt tctgggcatt 19740
tttgtatttc tagaaatact attattgagc tctgttctgg gatgcagtta ttaagagtca 19800
gtttgatcct ttgggtctt ctgcaaaaga ttgttaggt gggtatggag cagtgcacag 19860
tctagggcta atgattctca actactgggg catgacccaa cgtcccagga attatatgct 19920
tttcccagtc cagattctgg gaacaggcac tgtccctgc cctgtgtggg ctctgtcccc 19980
tccagtcctt ccagggtggt ctgtctggtc tcaggtagtt tccaagaca catgcgccga 20040
tcagatctct cagattctct gggcagcccc ctctcactg tcttctgtgc atgacctctg 20100
gtgcctcag tctccccag ttctcagccc tctctgtgc tggattctcc ccatcttccc 20160
cagcctgcag tgctgggtcc tggagactcc ccagggtca ccatgtttgt ttctctctc 20220
tcaggctctt tgttacctga catggagtac ctgaaagccc gttgtttcat gcattttacc 20280
tgggttttgg gttgcttcag ggggagggtg aatctgggcc ctgtgtctcc atcgtggtca 20340
gatgtgggag ttacacactg gcacactggc tttttttttt ttttttttg agacagggtc 20400
ttgtctgtc acctagctg gagtgcagtg gcacaatctt gactcactgc atctccacc 20460



tgctaagctc aagccatccc cccaccttag cctcccgagc agctgggacc acaggcgcac 20520
gccaccacac ccagctaatt tttgtatttt ttgtagagac agggttttgc tatattgccc 20580
aggctgggtct caaactcctg ggctcaagca atctgcctgc tgcggcctcc caaagtgttg 20640
agattatagg cgtgagccac tgtgccttgt ggacattagc tttttttttt tttttttgag 20700
acagagtctc gctctgtcac ccagtctgga gtacagtggc acaatctcgg ctcactgcaa 20760
gtcccgcttc ctgggttcac accgttctcc cgcctcagcc tcccagtaa ctgggactat 20820
aggcacctgc caccacgccc aactaathtt gtttttgtat ttttttagtag agacagggtt 20880
tcaccgtgtt agccaggatg ttctcgatct cctgcctcgt tgatctgccc accttggcct 20940
cccaaagtgc tgggattaca ggcatgagcc gctgcacca gccaaagcaa atggatttta 21000
aaaatgaact cttacaaaac tttgttctaa tcttgcttcc taatagccac gaatcaaaca 21060
ctttccttgg catttttaggg ttcatgagat ttgtgtgtgc cttgggaggc agtcaagtcc 21120
aaggcctgaa gtttctgat gcagtgccca agcccgggca aatggaagct tgaaattagc 21180
cctagctaatt gttttttttt ttttttcttt ctttcttttt tgagacagag tcttgctctg 21240
tgcccaggc tggagtacag tgggtgtgatc tetgtcact gcagcctctg cctcttgggc 21300
tcaaacgatt ctcttgctc agcctcccgg gtagctgggg ctacaggctt gcaccaccac 21360
acctggccaa ttttttaatt tttattttta gtggagacac gttttaccat gttggccagg 21420
ctggtcttga actctgacc acaagtata caccttctc agcctcccaa agtcttggga 21480
taacaggtgt gagccaccat gcccggtcct ggctaattgt ttctgagttg gcccagaac 21540



i

ctgtggccct ggttggccac actgctggct gggaggga caa ctgggtggct ctgcagcggg 21600
aagtgtggtt tggagtcagg tctcggtccc tgctctgggg ctggtccacc ctggggctgc 21660
tgctgcactt ctctgagct ttggtgtcct ggtcctgaga gtgaggcagc gaatgcccac 21720
ctagggggct ctggtggga tgggaagggg caaggagag cctctgagtc aggagccatt 21780
cccgtgagt ggctacctgg gggatgccac ccaggatgc ttgggtgggc actgggctta 21840
tggtgaacgt gaacatgcag gggcaggtgg ggtgatgcc agcactgtga ggggtggatg 21900
gtacaaagc tgctggccct gagaggtctg agggctcctg cctgtgggca gcgcagctgg 21960
gtgggcagtg ccagaaagag actggaagac tcaatgcaga gccagcagc agcgcagctc 22020
agcaggccag agcgcagagg cagatcaggg gtccctagca ttgcgcagct cagccactgt 22080
gtgggcagcc gcaggcccag gccctgccc cactcttctg gacctcaca gccctgagga 22140
gtgcctgttc ttgagtcctg agccagctcc ccatgctcac ctgtgtctt cttatcctt 22200
ccagccgcc agctgggaag gaaggtggtg gtggtggact acgtggaacc ttctcccaa 22260
gtaggcagc accctatggg agccgggtgt cctggggaag gagtgggag gtgggccag 22320
ttctgtaca gaggcagct gacaccaaag tcttcagcc ctgtgtcca tggtttctg 22380
acagtgtcct gtttactca tcattacttt aaagtcttg accattatcg aaaacaactc 22440
tgccaggtg cagtgtctca cgctgtact cacagcactt tgggaagcca aggcaggcct 22500
tgatcacttg agcccaggag ttcgaggcta tagtgagcta tgattgcact actgcactcc 22560
agcctgggta acaagagcaa aactccatct caaataaata aattaataaa tattaataaag 22620



taaaaacaac tgtttttatt ttcgagtaca gttatagaga gcagattcgt gtggcatgtc 22680
agctggtctg tgtagagtt acaaagcaac ttttaaggaat tccaaacact ctagaagaac 22740
agggaagcct ccagcagtca cctgaacata aattcaaattg tgctcttccc acgtcccagg 22800
caccgggtgg ggcctcggcg gcacctgcgt caacgtgggc tgcaccccca agaagctgat 22860
gcaccaggcg gcaactgctg gaggcctgat ccaagatgcc cccaactatg gctgggaggt 22920
ggcccagccc gtcccgcatg actggttaagg atctggcgcc gtggcattcc agtgcttttc 22980
ttctactctt ggggtggaaga ggaagaggag gcttatcctc gatgagccct catggggagt 23040
gggccgtagg atgggtttct cagccagggg cgactctgcg ctgtctgcct cagacatttg 23100
ggaatgtctg gagacagttt tggttgtcac tggggaaggg tttgctccc tttgcgggga 23160
gcccagggat gctacagcca tgcacagcac agccccacca agaacagtgc atctccaagg 23220
ccaggagtgc ggggtgggagg ccgcttcagc tgagctcttc tgggaagggg accacgtggc 23280
ccagccacac ccacattggc tcagataggc ctctgcctgc agtgggtagc ctttggggca 23340
cagagcagct gcatctggag agccgtgggt cagagcccct gttttctgtg agtccaaagg 23400
tctgcagccc tgagcctggg acaggcgggt gcacgtaggg atggatgtca cgttttgcca 23460
cctttaaaag cactcttggt tttgatatt tctatgaatg taccatttga atctaatagt 23520
ccatcgtgag gccctgcagc taacacctgt gttgtggatt ttacattttg tttcgtatct 23580
tcacaggagg aagatggcag aagctgttca aaatcacgtg aaatccttga actggggcca 23640
ccgtgtccag cttcaggaca ggtactgaag ctctctccgg gaatgggccg ccctctgggc 23700

cttctcttgg gcgttctgtg cctggacaca cacttactta ctgtgcagag catgctctgg 23760
caggctctgg gggttcatgt cctgctcatg ggtggggatg aggacaagga gcagatggga 23820
gtgactgtag gggaaggga gactgccctt tgctgctgag cagagcctgg aggtgctgcc 23880
aaggaatgag tgaggccaca ttggcagaat ggccagagcc cagggtgca caggaggag 23940
gcgcttgggg ctggaaggcc tcaggccaga gagcgtggac atagctaggc ctggggctaa 24000
tatgtggtga gggtcacccc agtggcaagc cccacccccg tgaacccctt tcttactgca 24060
cacctccagc tccttgggtg tgggtgcagg agcttgggtc ttccgctgg agcaaatgtc 24120
cctacttggc caccgttcc gtcagccctt ggggatctcc agcacagagg cctatgctcc 24180
cctggcctac aaccttctcc tggggctcag ctgccagcac agcagatgcc tgaaactggt 24240
accgctctg gccagcctt tctccgggg ctgtggaggg gacagtgtc ccgcagaggt 24300
ctggtggctc tcctcatgca ccatttgctt ggccccaggg cgggtcttcc tggggcttca 24360
cagcaggcag cagttttgtg ctactaaat ccaggaaagt ggagccagga agccaactgc 24420
ttgccctcca cctggacctc acaagctctc ccctatccag ggagctaagc cacattgtgc 24480
tgtggcattt ctgtgtttct ctgtggggt ctgtatcccc tggtagctt tcctggggac 24540
agcaggtctt gccctccctc ctccctgccc tgggcagctc ctggacgggc accaaacagg 24600
cccagccac tgctgctcc ggagccacct gcagaaggag gctggggcgc acctgggctg 24660
tttctgctt ttcactcttc tgaaaagtgc tgccatgagc attgcccggc tgtgtccgt 24720
ggcagcttcc tggctgtcga ggtgattgaa gggtcttgc ttaggaact tcacgcagct 24780

cagacagccc atagaggcac aggcttgcca gtggggagaa ggcaggctca agcaggaggc 24840
agagccttcc cagaaccctt gctgcagcac ggtccttttg tcattagaaa gtgttggtcg 24900
ggtgcagtgg ctcatgcctg taatcctagc actttgggag gctgagggtg gaggatcact 24960
tgagcccagg agttggagac cagcctgagc aacatagttt tattgctaca tccctacaaa 25020
aaataaaatg aactagccag gtatggttgc ccatgcctat agttccagtt acttgaaaca 25080
aggcttccgt gagctatgat catgccactg cactccagcc tgggtgacag agtgagaaga 25140
tgtctttaaa aaaaaaaaaa aggggtggggg ggggtggctc atgcctgtaa tcctagcact 25200
ttgggaggct gaggtgggtg gatcacttga ggtcaggagt tcaagaccag cctggccaac 25260
atggcgaaac cccgtctcta ctaaaaatac aaaaattagc caggcgtggt ggcgcaagcc 25320
tgtaatccca gcttctcagg aggctgaggc aagagctgag gcaagagaat ggcttgaacc 25380
tgggagggtg agattgcagt gagccaagat cgtgccactg aactccagcc tgggcgacag 25440
agtgagactt tgactcagaa aaaaaaaaaa gaaaagaaag cgtgggtcat ttgtttctgt 25500
gcactatgct cccagccact gttttgccag ccttgtcatg cccgttctct tgggtgttacc 25560
acaccctga aatcagaagg tgacaccatc tgggtgggcac cacagctccc tgctggaaca 25620
tgtccgggtg atgaggactg tcccaagag aggtccagcc acctcttgct gcacaccagg 25680
gctgtacgtg gcctcttagg accgtgctga gctggttcc gtcctgctt tgacacctgt 25740
ggttaacatg tccctgggat ccctggggga caggcgaggt gccccacat cccctccatg 25800
cttctcagca tggttccgc ttacctcttg gtccatctga gccacagcac caggccctgc 25860

tgggggctgg agctcccttt taccagtgtt ccctattgat ccagttggtg aggtttaatt 25920
tgcagaggaa gtgtttgaaa atcttatctt tatctttcag aaaagtcaag tactttaaca 25980
tcaaagccag ctttggtgac gagcacacgg ttgcggcgt tgccaaaggt gggaaagagg 26040
tgagcatctg acttactcgc gtggctcctt gtggaccctt ctgcagacct tgggcaccaa 26100
ctgcagctgt gtttggcctg ggtgctgttc ttagtaacac gtgctgctgg aatcaaaaag 26160
gtggtctctt ttgaggtgg gcacttgtct ttaacgtgat caaataattt gctgcctgc 26220
tgctcggagt ggcatggcaa cagggttggg gaccacacce tttttgcagg attttttggg 26280
gatttgaggg tgccttgaag tgcttgagtg tagaacatct cctgtgctt tctgectgtc 26340
cccctcctgc caggctgatt gttgatggga ttccagctcc atagggcctc tgaactgctg 26400
gccaaagggtc cacgtacag ggcaggggcc gtgggaactg ctggccaagg tctgtggtgc 26460
tcaggccctc cgggtgggggt gatcccatg cacctgtctg acccacggct ttctcttttt 26520
ctctcagat tctgtgtca gccgatcaca tcatcattgc tactggaggg cgcccgagat 26580
accccacgca cgtgagtgc ccagagcat agcgtccctg ctgccgtggc ccattcccgg 26640
cctctttgag ggatacgttt ttacacacgt gcttcccaca gcagcagctt gcacaccctt 26700
tccccctata ctactatca tcactttctg ctttccaatt ctcttgaatc cacactgctg 26760
aatgtgggg tccccagtgg cctccacgt gccagatcct caggacagct ctggttctgc 26820
tctccccctg ccccgctgga tctgtccct tccacaccag gatcctgctt cctaagtctc 26880
cattgctgat tccccctttt cccttcagcc tcagaatgtt ggaacattca ggatataagc 26940

ctcattcttc atcttcctcc ttcacgtccc ccagtttaaa aaaagtttga aataaaattc 27000
acacgtata aaatttagcc ttttttaggg tacaattcag tggtttttag tacattcaca 27060
gagctgtgcg gccatcagtc accaccatcc attgccagaa ctccttccat catccctgaa 27120
ctgaaactat tcccattaaa cctactccc cagegcctcc tccccagcc cctagaaacc 27180
accacctact ttctgtctct atgaatgtga caacactagg cacctcgtgt aagtgaaatc 27240
gtacatgtaa gtccttctca tgtaactggc acgtgtgtgt cccttagtga ctcgtatgtg 27300
tgtgtccctt agtgactggc ttacttcaact gagcataaca tctccaggt tcacctacat 27360
tgtagtgtgt gtcagtatca ttcttttta tggttagata ctattccatt gtaggatag 27420
accacacttt gtttatctac ttgcttggat aaacacatgt gttatttcca ctttttagct 27480
attatgaata gtgccgtgt gaacatctgc aaagaagttt ttggtggac ttcagtttcc 27540
acttctcttg ggttacactt aggagcagaa ctgctgggtc atgtggtaac tttatgttga 27600
atctttcaag gaacgttca aggaacctca gactgttttc cacaatgact gtgttttaca 27660
ttccttccag tgggggtgaa gggcatggt ttcttgttcc ttcacgtatc ttgtaatttt 27720
tttattgaaa gctgaacatt tcaaataatt taatgcgata actttggaaa ccagattctc 27780
cctctgcccc aggattctgt tgttacagct gcttatttgg tgacttttcg gaactgactt 27840
tgtagactct tattctttga tgtatgtggc cactgaagtc tttacttggc tagcttagtg 27900
gtcagetaag aactgcatgg agatttcctt aaactaagaa ctctcccggc ctttgctgag 27960
ggctctgtgt gcgtttggag gggatgcctt ccacactcaa caggcagcag acagctctgc 28020

cctagccttc acttcctgct tctgcagaga tcaaggtcag ctggaggtga gggttcaggg 28080
cctcgttggt ccttcctgat gtgtgcacag tgctgtgcat gcgcctggcc taggttccca 28140
ggaatatgct ggaacctttc aaagctccag cagacatctc atactttggc ttttcctttg 28200
aagctttttg ggcagtctgt tgttggtctt aactgttacc tatccctca ggcagctgtg 28260
agaagaaaac ctgagacaaa tgccccaga gaaaggttt tagccctggc tgagctccgg 28320
tgaagttgga tgaagatgac cctatagttg ctgactctga ctcttctttg tgggggggct 28380
ttgaaagacc ccagctgagt tctgctctct ctgacacatc actgttcagg gctgccgctg 28440
aggtgggagt gggaccagag tgagttaaaa caccctggag tteccattct cactcagctt 28500
cagctgtttt tcctgacttt aaatgttccc tgtgttgctg caagcctgtg gttaatttcc 28560
ataattctga atctccagct tcttgccagt ttatcgctg ttttaacag agaggtgaat 28620
aactcctggc ccagtcttgt gggttgtggg ggcagagttg aggaaggggc cccgggggtga 28680
ggggttgggg ggcagctgca gcagggaag caaatgggct gggggtgagc agagaggttt 28740
ggctgagacc agtccccacg ggtctcccag ggaacctgt gccgcctgct ccaagcctct 28800
aagtaggctg cagccaagct ctgaagacc acggctctct cggcctggag gccacaccac 28860
ctctgactta gaccagggg cagtccggtg gaggcagagc aaggggaggt tctgccactt 28920
cttgatgtg accccagcct ccacttcgtc ctgtgcttac tgtggaaca gggaaaggag 28980
cgccccgag gaggacaagc accccagtc cttagaggcc gtgggacttg tctggccgcc 29040
aggcagccac agcagcctct agagggggca ggttgcttat gcacagaggt ggggctcagg 29100



gctgcgtgac ttttaggat gacactgtgc agttgttcaa ggcagctgct gcagacaggg 29160
tcccagtgat cccctctcct ggcagctggg ctcattgttg ttctgcttaa agaaggccac 29220
agccagcttc cagcagccca gcggtcattg ggtttctctg aggccccagg cagagctgca 29280
cgtgcatccg caccagggag cactgcacag gggccctggc ctggcccggc cctgctctgc 29340
acctcacggg cagctgctga cggtctttg ggtcacagg ggatccagca ggcgtcctg 29400
gtccttagga ggcaggcagc tcagggtgc ttctctctcc ctgccacgcc ctcccagggt 29460
gtctgccaag gcttgcttgc gtttagtcc ctttgattgc cagaccttc ggttttcctt 29520
gagtaaact gagaaattcc tgactttatt ttttttgcc agttggaagc ataaactgtt 29580
tgagatccgc ttctccacc agcacatctt gttctcatgg ccgctaaggg gacgttcacc 29640
ctgggcctcc cacctgcttg gccgcccctc ttcagggtgac ctgtatgatt tctgggetca 29700
gagcccacc gggccagccc tcgagagtgt gaagtccgtc ctggcttcag ccaggtgccc 29760
tcagagctgc cctcagtc ctgccacct cagcctgtgg cacttaccct ctgtgcctcc 29820
tctctctgg ctggccttg aggccacccc tgccgcgcag acacacctga gctctgctgg 29880
cctgatttg ctgacctgtt ctctccccc ttctctctc tgagtttgga tccccagaa 29940
cccagtggt gtcctctgg gctgcatgcc cctgtctgtt tgatgtgtct gtccagaacc 30000
cgggcagact tgaggggtcc cagctgtctg cctgtatggc cctgcagtt gctgtacca 30060
cctcagggc tgtatctgc tctgaaccag ggtcaagggg aggtccttg ggaacagagg 30120
ggaaaggtac cctgcgaggg caccgggacc tggagtgcag cagcttagat gcagacaggc 30180



cacctgcagc cccaaagagg ccacagcctg cagacaagga ctggcagcag ggaagccctg 30240
tgcattgttg ccttgggaaa gctctgcttg attctgcaaa gctggcatcc tctttaagga 30300
agccctagga caggccaaat ggagctcttg tccaaggggt catttctgtc ttgacagatc 30360
gaaggtgcct tggaatatgg aatcacaagt gatgacatct tctggctgaa ggaatccctt 30420
ggaaaaacgt aaggcctgcg cgtgcttggt ggggtcctct tttgttcac cagagtgagc 30480
actggaccct tagagcctgt gctggtgctg ggctcctggg gctttcttcc cggtttaccc 30540
aaaagaagga aaaaaggcct gttatttctg gccaggtgtg gtggtcatg cttgttagcc 30600
tagcactttg ggagactgag cgggaggatt gcttgaggcc aggagtcca gatcagcatc 30660
agcctgggca atatagttag acctctactc tacaaaaatc tgttttggtt ttttttttgg 30720
cttttttttt taggtggagt ctactctgt cgccagact ggagtccaat ggcccaatct 30780
tggtcactg caatccctgc ctcccaggtt caagtgttc tctgcttca gctccaaaag 30840
tagctgaaat tacaggcgcc caccaccaca tctggetaat tttgtattt ttagtagaaa 30900
tggtgtttca ccatcttggt caggtgtgtc ttgaactcct gacctcaggt gatccgccca 30960
cctcgtcttc ctaaagtgtt gggattacaa gcgtgagcca ccacaccag cctacaaaaa 31020
tctgaaaata ttaaccgagc atagtactgt gcacctgtag tcccagctac ttgggaggct 31080
ttaggtggga ggattgcttg agcccaggag gttgaggctg cagttagctg tgattgcacc 31140
actgcgtcca gcttgggaga gtgagacctt gtctcaaac taaacaataa acctgtgact 31200
tgtgcccctc tgcagggtg ttgatttact ctgtcctgtg gctgccttgg agtaataaac 31260

aataacagga ctgcatata aatggagtca gctgtttgtt atctaggta gtggttgtca 31320
aatggggttc ccaggagccc tggggttcca gtgggtcccc tcaaggacat cagggagaac 31380
attaaggagg ggagagccag caatccctat cccagcctc atctaacc ctcactgtct 31440
tctgatttgt acattgggtt tccctgaaat ctacaaaga ctcaaaggc ctcagaaaca 31500
acatcttgat tgtgaaggg aggttagcag cgtgcaagt gctctcact cccatgggag 31560
caggtgcaga gtcactaagt gcattccgat gccacagag tgggcatcc cgaggtccca 31620
ggtccaggca gtcctgcct gtgggtgtg gagacttcat gttggcagg agcagagaga 31680
ccaccagagg gcggcagagg cttggtcaat agcagtctg agccttccc aggagaaaat 31740
atcagtggaa aagggtccca cttctgtgtg tgccgaatg tgcagtgtg gcgtgcagat 31800
gtgtgtgtg tgtgtgtgt aatggtgtg gtgtgtgtg tgtgagtgt gtgtgtgtg 31860
ggtgtgtgag tggtgtgtg gtgtgaagg tgtgggtgtg tggtgtgtg gtgtgtgag 31920
ggtgtgtgtg agtgggtgtg gtgtggtgt tgtgtgaagg gtgtgggtgt gtgtggtgtg 31980
tggtgtgtg gtgagtgtg tgtgtgagt gtgtgtgtg ggtgtgtgt gtgtgtgtg 32040
gtgaagggtg tgggtgtgt tggtgtgtg gtgagtgtg tgtgtcgtg gtgtgtgtg 32100
tgtgtgtgag cagtgtgtg gagtagtgt tgtgagtgt gtgtgtgtg atggtgtgtg 32160
tatgtgagt gtgtgtgagt ggtgtgtgt gtgtgtgtg gtgagtgtg tgtgtggtg 32220
gtgtgtgtg tgtgtgtat tgagtgtgt gtgagtgtt atgtgtgtg gtgtgtgtg 32280
tgtgtgagt gtgtgtgt gtgtgagtgt tgtgtcacat gctctgttg tcattgttc 32340

acacttcacg gggcatcttt gtgtggggtc aggactggat tcccttgaat ggatgtggta 32400
tagttccctt gacctttctc ttgttaatga gcctctcagt agtttctctt cttcatcatt 32460
atcaatgctg cagtgaaaac cttggagggtg catctgttta ccatcagaag tgcttctgac 32520
acattttccc aattattcat tgtgataaaa cagacatagt ataaaattta ccactttaac 32580
cttttttttt tttttttttg aaacagagtc tcaactctgtt gcccgaggctg gagtgcagtg 32640
gtgcgatctc ggctcactgc aacctctgcc tcccgggttc aagcgattct cctgtctcag 32700
ccctctgagt agccgggact acagggtgtc gccaccacac cccgctaatt tttgtgttt 32760
ttagtggaga tggggtttca ccatgttggc caggctggtc tcaaactcct gacctcaggt 32820
gateccactg ccttggcctt ccaaagtgtc gggattacag ggtgagcca ccaccccag 32880
cccagttaa ccatttttaa gtatacagtt caatggtatt aaatgtatta ataatgtcgt 32940
gaaaccatca ccactatcca tgtctggaac tcttttcac catgttgtat ctgcatttcc 33000
ttctttttta gactgagtaa tattccattg tacaggcaca ccacatttg tttatccatt 33060
catctgtcag tggacacca agttgcctct gcttcttggc tgttgtgagc agtctgccg 33120
tgaacatagg tgtgcaaata cctcttgaag acctttcagt tcttttggt gcaaaccag 33180
aagtgggatt gctggatctt atggtcttga ggaacctcca tctgttccc aacagcgccc 33240
acaccatctt acattctcac cagcagttca ggaggactct gggtcccca catcctcgcc 33300
agtgcagttt gttttctgtt tttctttctt taatttttat ttttcttt aaactgtttt 33360
cttgatgttt tctgtttttt tgacagtggc catcctagt gctgtgaggt ggtcttatac 33420

gctttacaag gggagctgcc ctccgtctt aacactttgt gctgacaggc caattccatg 33480
tgtactctgc ctgcttcctt gtccttggtt actcaggcat cagctttttg ataagacaca 33540
aaacagaaaag gagcctctcc tccataccc ctggcctggg cagtgggtcac tgctacccat 33600
ggcgcccaca ctctcctgag agcagtcact gctaccacag gcgcccacac tctcctgaga 33660
gcggtcactg ctaccacagg tgcaccaca ctctcctgag agcagtcact gctaccacag 33720
gcgcccacac tctcctgaga gcggtcactg ctaccacagg cgcccacact ctctgagaa 33780
cggtcactgc tccccacggc gccacactc tctgagagc tgtcactgct acccacggcg 33840
cccacactct cctgagagct gtcactgcta cccatggtgt gccacactc tctgagagc 33900
ggtcactgct acccacggcg cccacactct cctgagagcg gtcactgcta cccatggcg 33960
ccacactctc ctgagagcgg tctactgtac ccacggtgcc cacactctcc tgagagcgg 34020
cactgtacc cacggcgccc acactctctt gagagcggtc gctgtaccc atggtgcgcc 34080
cacactctcc tgagagcgg 34140
cactgtacc cacggcgccc acactctctt gagagcggtc 34140
actgtactc atggtgcgcc cacactctcc tgagagcgg 34200
cactgtacc cacggcgccc acactctctt gagagcggtc 34200
acactctga gagcgggtcac tgctaccac gcgcccaca ctctcctgag agcggtcact 34260
gctactcac gcgcccacac tctcctgaga gcggtcactg ctaccacagg tgcaccaca 34320
ctctcctgag agcggtcact gctaccacag gtgcaccac actctcctga gagcgggtcac 34380
tgctaccac gcgcccaca ctctcctgag agcggtcact gctaccacag gcgcccacac 34440
tctcctgaga gcggtcactg ctaccacagg tgcaccaca ctctcctgag agcggtcact 34500

gctaccacag gcgcccacac tctcctgaga gcagtcactg ctaccacagg tgcgcccaca 34560
ctctcctgag agcggtcact gctaccacag gcgcccacac tctcctgaga gcggtcactg 34620
ctactcacag cgcccacact ctctgagag cggtcactgc tacttacggg gcgcccacac 34680
tctcctgaga gcggtcactg ctaccacagg tgcccacact ctctgagag cggtcactgc 34740
tacttacggg gccacactc tctgagagc ggtcactgct atccacggcg cccacaccct 34800
cctgagagcg gtcactgcta cccacggcgc ccacactctc ctgagagcgg tcaactgtac 34860
tcacggcgcc cacactctcc tgagagcggg cactgtact catggtgcgc ccacactctc 34920
ctgagagcgg tcaactgtac ccatggtgcc cacactctcc tgagagccgt cactgtacc 34980
catggcgccc acactctcct gagagccgtc actgtatcc acggcgccc cactctcctg 35040
agagcgggta ctgtactta cgggtgcgcc acactctcct gagagcgggc actgtaccc 35100
acggtgccc cactctcctg agagcgggta ctgtactta cggtgcccac actctcctga 35160
gagccgtcac tgctatccac ggcgcccaca cctcctgag agcggtcact gctaccacag 35220
gcgcccacac tctcctgaga gtggtcactg ctaccacagg cgcccacact ctctgagac 35280
tgtgtgagc ttgtgtggt ttccatgcac tgctgtgc ctccattgg accactgat 35340
cgtggtttgt ctttggaatt ggtgatagta ttccatgcag aaattttaag tttttctgtt 35400
gtcacaccaa tcaacttttc ctgttatgcc ataatttctg ggttatctgt tttttatct 35460
ttgagacagg gtcttgcct gtcgcccagg ctggagtgc gtggtgcgat catggctgc 35520
tgcagccttg atctcctgga ttcaagcaat tctctgcct cagcctcctg agtagctggg 35580

attacaggcg ctgccacca cgcccagcta atgattattt ttttagggc aaggactcgc 35640
tatgtggccc aggctagtct tgaactcctg ggctcaagt atcacctgg cccctcaaag 35700
tgctgggatt acaggtgtga gctacggcac ccagactgtt ttttaatct ttgactatct 35760
gctgagttac acatgatctg actctgtttg catttgcgt gatcagtgt ctttcacac 35820
atttacctga aaagcctcgt gtcacagcct catttgagat gagcgtgtc gtgagcatgc 35880
ccatgtgtgc tgcacaaatc gccagcatgg tccttgtcca ctttcacgtc tggcttttct 35940
cttctcttat ctctcttac cctccagctg gtttgtgtat tagggatgtg atcctctgtc 36000
gcttgttgtg cagattttct cagcttctag tgtcttttaa cttgtgtgat gtacaaatgg 36060
tttaagtttt ttttaatgta acttaaatct ttacactta gtggcttttt gatttattgc 36120
atgttcagaa aggcctgccc caccccaag atttttttt tttttttta agccctgtat 36180
tttcttatg ggcgtccaca agtcggattt tcttttactt ccttgggctg gctgcacttc 36240
ttctgcggtg tgggtggagat ggggtgcccc ggccccagt cccatctcga ggcactgttc 36300
tcactcggcg tcctgagttc tgctgtgcc tctggtgtc tttcacgtag gcttctctgg 36360
gtggagtctg gatgcccctc cagcccctgc aggatgcttt gtctgctgga cttcaggga 36420
aatggccttg gatgtctggc agccccagga tgtctgctgg gccctcgat gtactgggg 36480
cttcggtgac ggtcactgca gcccagcact ttcaccacc tcgtgtgcc tgttcccctc 36540
agaggctgcc cgcttgggcc tggggagggg gcccggtgct ctgggtgcc tggccttgct 36600
gtctccctag caaggtggct ggggcttggg gagcgtcct ctgcaaccct gtgctgggg 36660

cagctggctc ggccgggaag acacagctcc agatattttg ttcagaaaag aaactgcagt 36720
gtttattttc ttcagaaaaa aaacatttag aagatttttt ttaaagctct ttcgtttaga 36780
aggaatctag gtatgttatt gttaagaaa aaaagtgttt gcaatgtatc agtcacccgt 36840
ttcattctga gcatgattta tgtgaggaaa tggttttttt aaaaattaag ctggagatat 36900
atccctgtac gatgcttctg tgaaaatgcg gcttttgtcc ggcgctgtta atgcaagttg 36960
taacagtgtg atatgggagt cagtgtttac atgttacatt cctctgctgc agtcaaaata 37020
agcccgagg gctacagta gcatttctgt atttatcag cttgggctgg ggctgagggg 37080
aggcctccac tcacacttg agggtgtt tctgccagat ttatttgcct tataaatatt 37140
ccccatgttt attttaactc gcctttaaaa tggagctgaa attaatatgg accccggggc 37200
tgctcccctg gcccctgagt gcctcccgtg gtcgggtggg acatttctac ctggtcccat 37260
cctggaggcc aggtgcgcaa ctacaggtgc ctggcatcac agtgcacctc ctgcagtggg 37320
cactctgtcc cctggttggc tcctccacca aggaggtcc ctgtccccct ggccccaggc 37380
ccteggtggg ctctgcggcg tgcacgaggc ctccctctc cctctctact acaggcacag 37440
gctgccacca ggaactcctt tcagcgcacg tctgtgtggg gccactgcc gggagctcca 37500
gatctggcga gtggtgccc cagtggggcc tgggaccag cctgcaaggt cgtaccatgc 37560
cacttttgcc ccagagaggc cactcaggca tcacagtga cctcggggcc caagttggga 37620
gcccccttc tcctttgttt gcatccaggt cttaggagc ccagggtgg acagatggca 37680
gaggcagggg gatcgtgtcc aagctcagtc aaggggagac agaattaaac agtgcacttc 37740

actaacagc catatgctgg caaaatgggg ccatacctgt tgaccagagt gggctgagca 37800
cctggtttgt aacctaggag ggtgaggaag acgtgcagaa aactcagaaa actcctgaaa 37860
aagcagtgtg agcttgtggg tgggtgagca ggacccttga gtgcactggg gtggggcggg 37920
ggacgttctg gctgccccac tcccatagcc acgccctggc gcaagggact gtcctcccag 37980
tcttggtggg gaccctggga aggactccag gtcggctcct gtcgcgctc tgccatgcag 38040
atgcccgcct tgtgccagcc cgtttgcctt ttctgctgtg ttgtgtcttt cttctcttg 38100
aactgcaaga caggttgaag aagagaggag gtttctgggg aggtacagtg accctgggca 38160
ggcagtggag cccctctggg aacaatggc actgcagga ggcaggggtg cggaggggca 38220
cgtgaccca aatgactagg ctcagagggg gcatgcagcc ttgcaaacca aaccttccat 38280
tccacagagc aagccccgg caggtggagg aatgtggaag gcgaggatgg tgagcccaca 38340
ccggggagct ctttacaga ggcaggcact gggggtcggg atccaagtgc agccaagagg 38400
agcccgaggc ccagaggggc ctggcaatta aggggggcca aggagctgag ctccaactcc 38460
agtccacag ccgcacaatc ttctgccac ttctgacct ggagggtgc ctccaccggg 38520
aagcctccgc acccggcagg gacttgggcc ccgccagtgt gccttgtctc tgctcttg 38580
acaccacgg cctgggctt cgtcttctcc ctcagtgcc ggttttgag ctcagtgcc 38640
ctaaccceaa tatagggaat tgtgtccct ctattctagt cctccctctt gctgtgtctg 38700
taggtccgct ttctgaaag cagggtctg agctggcaac actgggatgg ggccgagggc 38760
gtgaatgaga ccgcagctc ctctcagtc cgataacgga agtactgctt cccgaaaca 38820



accagggctct gcctgttcct gctgccagct ctgtagcccc tgcccaggtc cccgtggggg 38880
tttacagagc atggggccag cctctcctgc agctgccagg ctggctcagg ggctgaccag 38940
cccacacact gggccctggg ggaggggctg cagccagcca ggcctgtcca ccctctgagg 39000
ctgtccacc agcctgctgc tgtctgtcct cgactcctg gggctccaag aggcagagtg 39060
ttttataac ttgggctggt ttaaggctgc ctgtcagtgt gtcattggaaa gagcttttat 39120
ttgaccctta ggaagtccgg aagccagcca ggtactgca tcatttttct ctcttcctaa 39180
gcacaagagg gaagaagata aattttatct tgggaagaac cacagccatt tgggagaaaa 39240
tttaatttaa gtggcacatt ccgctgggtg gatgggatgt ccttgtgttc agcaataggg 39300
agaccagctg tcctcctggg gcttgttacc agactgcaaa gccctgtcca cctctctgtg 39360
tgcttcctg tggctaagac atgacaaggt agggtttca gtggcatttg ttacagggcc 39420
agcacacaga ggctccggcc cagcatctgc ccctgagggg ttgggtgggg cggcggggtt 39480
ccagccaagc cggggaagga ggccttcgta gcacccccag ccctgtgctg cctccctggg 39540
gcatctgcag ctggcggcc catctggtat ttctgggct ggcaggacct ccaaggggcc 39600
aggtgcctcc catgagactc actttgtgtg agtattccct ctggagagca ggccttcaag 39660
ctcaagagc agatggattg ctctttaage ctaggtctcg tggcctgaa ttaatgcttt 39720
tgtttctgct tcctcccccc attccaattt tgaacaagaa agcctgccct gtgattaggc 39780
tcatectgca gtagttatta tgctctttg gaaaatgttt gcacacaaa aagcacagag 39840
agctgagctg ctgggatcac atggaaaact gatttttatt tgttttgttt tgtttgttt 39900



agagacaggg tctcactctg tttcccgggc tggagtgcag cttactgcag cctcaaactc 39960
ctaggtctaa gtgatectcc ttcctcagcc tcccagtag ccgggactac aggtgcatac 40020
caccatgccc cagtaatfff tttagtttgt agagatgggg acaagctgta ttgctcaggc 40080
tggtcttgaa ctcccgggct caagcagtct gtccaccttg gcctcccaga gtgctgggat 40140
tgcacacatg acccaccgca cccaacctct gggcttttta atgcagcggc aagttgagtg 40200
gttccagccc cctaccccca ggtcctgtga gctggctccc tgacttctgt ggccagcacc 40260
tctgacttcc tgtggccagt catggcttga gttggttgct gcaccagtt cctgtctgtc 40320
cctacccttg ctgggccgtg aatggcctga agaaggtgtc ttaggtccc tgtctttggg 40380
tactctctat cctgtgatc tggaggcttt ggtgtctgtc ttattttgct cgggcatttt 40440
tttactttag ctggtctgaa cggagttctc tgttggaatt ctggtatcct gcattcttca 40500
aagggtaaac attcacataa tttgatcaat gcggggaggc gtacagtga aaccaatgct 40560
gtcaataatc cttgctcatg acaacaagaa gaggccaaa atgacctcc acacgagcga 40620
gacgtgagct tttgttgaga gatitcagcc gaacacatag ggtcaaggat gccactcgg 40680
gaatatgccc actgcacca cctcctccta gctgtacct cagttgctga ttcagagctg 40740
gcagctgagg gatgggggca cctgtgactt tgaaggtggc ccttgaggcg ggagcttctc 40800
ctgtgccccg tgggtgccag gacaggaggc ccgggcactg ggggactccg agggagggcc 40860
tggagagtca cctgcccccg ctccaatcca ggctggtgg gtcagcatcg ttaggaggt 40920
ggggatgtac acgtcgttg cagagacagc aaacatttgt ggcaaatca ggagggtgtg 40980

ttgctgtatc cctagcaatg agctaggagg cccggagagc agcctggccc ccatcctgca 41040
gctgcagggc ccattcctgg agaagggttg gccttcaggg ccaggaaggc cctgacgtgc 41100
aggggcccag ctgcccacag aggggatgca ttggcctcac tctgccagtg cctgcacagc 41160
ccagcaggaa gcatctagcc catgcacagc cacctctggg agcagggggc aaagggcacc 41220
acacaatggg ctctcgccca gttacaccct tgcatttagg gcaggatatg caaagcagca 41280
gagttctgtt tatatttgca gtaactcata acttcatatc tttttttttt ttttgtgatg 41340
gagtcttget ctgttgccca ggctggagtg cagtgcacag atcttggctc actgcaagct 41400
ccacctctg ggtttacacc attctctgtt ctcggcctcc ccagcagctg ggactacagg 41460
cgcacatcgc catgctcagc taattttttg tatttttagt agagatgggg tttcaccatg 41520
ttagccagga tggctcgtat ctctgacct cgtgatctgc ctgcttcggc ctcccaaagt 41580
gctgggatta caggcgtgag ccaccgcacc tggccataac ttcatatctt aaacaaaagc 41640
ttgtaccttt cactgcatat agcaagtcca aaaagagttt ggtttcgcca ttttggaagt 41700
gcatttccgt gtagagatgt gtatgtggtg cctatgtgtg tgtgcatgtg tggaagtgcg 41760
tgcataccgt ggtgcctgtt tcccaagtgt tgccggcctt gagcggggct gggaatgcat 41820
ctctgcaatc ctgcttgget gggggtccca ggggtccctt tcgctgtcct cacatgctga 41880
gtgaggcatg taaccacett gtgctcagcc ggccaacaga gctctgtctg ctcaccctaa 41940
tcctgacagt ggtgcggttc tgtccccagc cacagtgagg aagctgcatg ccagatgctt 42000
ccgcagggc acctgcagaa tgattccaag ggatacacg tgttttgaaa tggaattata 42060

tcattagtac ctgctgggat tagcaatgac attgggctta tccgtcctta catcacctcc 42120
tcttgttcaa agactgaagg gtaatgtggg agcccacca cgtgcagctg ccccgctggg 42180
agttcttggt cgtgttaggt tctgtgcccc tttgcatgtg tgtgcatgca tgtgtctaca 42240
tgagtgtgtg catatgtata tatgaatgaa tgtacccatg cgagtatgtg cgtgtgtgtg 42300
tacatttgtg cccgtgtaag agtatgtgca tgcaggtgtg tggcatgtgt gcacatacaa 42360
gtgtgcgtga gtacatgtgc atgcaaaaca catgtggagt gtggggttga acaatagagg 42420
gttttacta caagagcaaa tatttccaat gactgctggt cgcagtgtcc tgtgtctgct 42480
cccttgtccc tggggtcctt cagtcacctc tctggggagc tggccctcct ggccctgccc 42540
ctagctgtga tagggttga tgtgcctctg gcacatggaa gggcccagcc ttctgtggtc 42600
ttgagagtgc tttgtcaga tgatgtcttc ccttgcggtc tgggtggcctc cccatcctgc 42660
caagcatctc ccagcttcca ccctagccca ggaggcccc gggggagaga aggaaagcca 42720
tgtgtgtctc tgggtgatgt ttctccatgc ctccgggtgc cttccagggg acaggtacca 42780
cttgtcactg acacacacgc ccttcaccac caggcgattt gctgattcac aacatgcttg 42840
acagtgtagc ctiggaaagt gggctttgtc ccttggggca agctgtttga acagtaacct 42900
tggagcccac gagctgacca agggcctggg caaaggctgc ggggttctgc tctgactgca 42960
cttggccaat aagggcctca gctttacatg tgctctctct ctgtttctct aacaggttgg 43020
tggtcggggc cagctgtatc ctttgcaagc gtgcaggtgg ccgtcctggg aactggacac 43080
tccttccctt gagtccctcc ctgccaccg ccttccggc aggtctcttg ctgcctcaga 43140

tcggcactta ctgggcctct cggcgtggag gatctactgt gcctggggac agtttgaggc 43200
tgacctctgg ccagggattc ctggaggctc ttcctgagct gggacagctg gacatggcca 43260
tgaggcagct gggctgtcct cctcaagag cagccccagc ctggacccat tgcttcagaa 43320
gggacaatta gacagggagg gtcaggagag gagctgcagg agggcctggg gtcaagggga 43380
catctgaggg agatgaaagt cctggccgg gcgcggtggc tcatgcctgt agtcccagct 43440
acttgggagg ctgaggcagg ggaaccgctt gaacctggga ggcagacgtt gctgtgagct 43500
gagatcatgc cactgcactc cagcctagge aacagaatga gactccatct caaaaaaaaa 43560
aaaaaaaaaa aaagccccaa gccgttggt gagagcacag gtggaagaaa gcagctgcct 43620
ggcatctccc gtggtgagg tcctccctga accagccact cctctccatc ccaactggaa 43680
tccaccagga tgcaggcctc gccctggagc cgggatggac agcacatggg agcagaggcc 43740
agaggccggc ctagtccgtg ggtgtgtctt ggcggtcct tgctaacccc agcctgtgca 43800
cttgagatgt ggaggtgggg gtcttgagtt gggagcctcc tccagggccca gccatggatg 43860
ggtggggtgt gggctgtggc acagggccct ggggtgttgt cccatcattt caaaaattgg 43920
gatctacagt gtccttagc tggcacccca cagatgtggc cctggagtgt gctggcttcc 43980
tcaccgggat tgggtggac accaccatca tgatgcgcag catccccctc cgcggttcg 44040
accaggtagt gctggaggcc ccagctcccg ccctgtggc tctgaggcct tcctcccaca 44100
gccccctccc aggcaggtgc agtgcagtca tgggccacga gtgatgcctg aatctttaga 44160
gataaccctt gaattggatg aggaggttgt ccaggaaata tgcagacact cggccggagc 44220

gagggaggag ggtggcagtg gggcgcacag ctgcacagag gcctccagcc gaccacaggc 44280
acagtgaagg gaggtcagc ccagccttgt gccggcagag caggtcaccc tccgggtcgt 44340
cccattagta agaggccggt gtgtgctgca gaagtgttag cccacactca gagaccccca 44400
actccctgct ccccccttgc ctgtcccctc tgaggagtg ggggtgaaat aagctgtaat 44460
gtgtgagctg gggtagagga cacagggcag cgctggctcc gagacagccc gtgggatctt 44520
ggcttctgga caggtgcgct gtgtacagtg gccttcactt gtgtctgggg tacacacact 44580
catgtggcca gcaggacgag ctccatagatt ggagcaatag agattttctt tttttagcta 44640
aaaactcttc aagggaagt ctctgttaa aatagaagtc tggagtgtc attgtggaga 44700
tgtcaaacac tccatgactg ccacgaagga ggccccctgc agggtagct gtgcagatct 44760
gcaggccctg ctacaggtcc tcggccgacc ctgagctcac agagcctgag gaggtcacct 44820
gaggtgggag gagccaggcc tgtcatctcc agactcccag tgccacccc aggtgactc 44880
agagacgtgt cctccaccc gtgtggccat gtgtgttcc atcctaaagc tatggcacac 44940
tccatcatg tccctcagtg caaacccacc gagccctgtg gtagggacgc agtgtctagg 45000
aaggcctcag agccttcaga tgtggggagg gtgagctggc agtggacgga ggaggaaagg 45060
ggcctgcaga atgggggccc tgcccaggca aggaggatgc acagtctagg cagccaggct 45120
gaggggcgag ggaccctgtg tcctggacag gctccatggt tctccctcag agcctgggat 45180
ggccatgcc tccaggcctc tggaggggtg caggagtgat gaacagcctg tgcggcagcc 45240
cctctgcagc acagccagcc ctgcccggcg ggccagactc ccacacagc catctagagc 45300

cagctggcac acccgcacag gtgtcagagg atgttagcag tgactgtttt tctcctcttg 45360
aaaccagaag ctgtggccag cticactgct ggtccgtgca agtccccatt gtcctgggaa 45420
cagggccccc atctgtagct ggacttgggg cgcacaggcc tcctgggccg ggagggagaa 45480
gcaggactct ctctgtccct gatctggacc tgagcctgct gtgcctacat ttctaggcgg 45540
gagcagagtc tcctacctac cctcctggct cctggatggc agaggggcat gttggccaca 45600
tgtggagggg tgggccagga gcaggggcca tcttgttga ccagggcaca gtcctgggg 45660
gaaggcacgc ttctctgcca ttggttttag tgaagactaa gttttttgtt tttgtttttt 45720
aaagaaatgt gtagatgtac caggatttgt ttgtttttct tcttttttct ttcttttttt 45780
tggtttgaga cagagtctca ctctgtcacc caggctggag tgcagtggca caatctcggc 45840
tactgcaag ctccacctcc cgggttcacg ccattctcct gcctcagcct cccagttagc 45900
tggaactaca ggtacctgcc accacgctg gctaattttt tgtgtttttt agtagagaca 45960
gtgtttcacc gtgttagcca ggatgatctc tatctcctga cctcgtgac cgcccgccctc 46020
agcttctcaa agtcttgga tcacaggtgt gagccatgc acccgccctt gcttattttt 46080
tcttttagag atagagtctc actctgtcgc ccaggctgga gtgcagtggg gtgatcacag 46140
ttcattgcag cctcaaactc ctgggcttga gggattctcc cacttcagcc tcccaaaagg 46200
ttgggattac aggtgtgacc gtatctggct gatgaagact tagttaatta gcatctagag 46260
aggagccac aggtgagtg aatcctgacc ataggccca gggttgagga cttggagcca 46320
ggacaggggc tagacactcc acagagagca agaggacgta gagcaggggg cagggtgtct 46380

caccccgctct tccgcacaga cccctctccg ccttcattg aggccttcga gagcaggcca 46440
gggccagagc ctctctccca cgccacctg gtcttcattg cctgtcttct tgtgttttgc 46500
agcaaatgtc ctccatggc atagagcaca tggcatctca tggcacccgg ttctgaggg 46560
gctgtgcccc ctgcgggtc aggaggctcc ctgatggcca gctgcaggc acctgggagg 46620
acagcaccac cggcaaggag gacacgggca cctttgacac cgtcctgtgg gccataggta 46680
agggcacgtc gagccacacg ctctgtctct ggtctccccg aggtgcatgg agaattcttg 46740
ccccacttcc tgtcacctcc cagggtccc ccatctgtc ggtgccagg cgggttgccc 46800
gctccccagt gcacctcgag agcaaccgtg aaggcctgtg gggcggcact cactaggc 46860
tgtgcccata ttgcatccc cagcacctg catctctgcg tgtctccca ccacctggg 46920
acatgctgga aaaaaccaga gaagagactg agacggcatc agccagggtg cctcatcgag 46980
gatcaactag gcaatcatcc tcgcttccc tggcccttga gcaattgctt attaaggttt 47040
cagcacataa atcctacttg tcacctcca ggtttaagtc ttggtatgtt tcttttctt 47100
ttttttttt tttgagatg gagtctcgt ctgtcgcca ggctggagt cagtggcaac 47160
ctccgcctcc cgggttcaag cgattctct gcctcagcct cctgggtagc tgggctaca 47220
ggcggccacc actacacctg actaattttt gtatttttag tagagacggg gtttcaccat 47280
gtaggccagg atggtctcaa tctcctgacc ttgtgatcca cctgccttgg cctcccaaag 47340
tactgagatt acagggtgta gccaccgcac ctggccagta tgtattttt ctttagcata 47400
ttaaagtgtt tgctgcttca ggctttccag ctaggtttt ttctttttt gcgtgtgaaa 47460



cagggctctct cctctgttgcc taggaggagt gtggtggtgt gatcatagct cactgcagcc 47520
tccacctccc aggetcaatc aatcttccca tctcagcctt ctaagtgtg ggattacagg 47580
tttgagctac tgtgcccagc caagctagtt tgttgttttt aacataaaaa tgatatggat 47640
ttgaaagttt taaaaattat ggtgacatac acataacatc aaattcatca tcttaagcat 47700
tttaaagtat atagttcagt ggtgttaagt acgttcatat tgtacaagca gcatgaccat 47760
ccatctctag aacttttcca ttatctccaa actgagctct gtccccatta aacactcact 47820
ccctgtgccc cgggcactca cccttcactg tgtgtctcta tggatctgac tcctcgaggg 47880
acttcatgta agtagaatca tgcagtgttt gtccttttgt gactggetca tttctcttag 47940
cacaatgttt tcagggtgca tccatgttgc agcatttgtt agagttagca tttgtgtagc 48000
atgtgccagc atttccttcc tgttgaagge tgagttgtat gtgtgtccat tatctgtcag 48060
tggacactta ggttgcttcc gtcttttggc tgttgtggat catgtgtctg tgaacatggg 48120
tgtgcacaag ccgcctgttt tcagcacata aaaatgacac agagttttta aagttctgtc 48180
cagccttctc gtggctttca gtgtttccca gtgggtccct ttgggcctgg caggatcatca 48240
catgccagga gtggcatttt gcaggccttt ccagaagtca catttgaag gcttccaaag 48300
acatcacctt tccagtgtg ggcagaggcc tgggcgttcc ccggccaggc gtgggctggc 48360
tacaacttgc tgggcacagt ctggtctcac cttcttgctc tctgtcaggt gtaggtccgg 48420
ttttgcatgg ggcagtggcc gagcaggtgt ggggagtgtg gacacagcca ggggatacct 48480
gtgcccaggc ctgggccggg gctgtctgac gggactggca aggggcagct ggagccaaca 48540



gggatcgccc agacactgct ctgtcccagg cctgctgcag aggaggccat tgcagatggg 48600
ccgccgcaag gagggctgcg ggttctcgtc aggggtgggtg gcggcacaca cagcatgcct 48660
getcagatgt cctaccacc tgggtgcctg gccgtctagt ttaggtcct agttttccca 48720
atcacctgt caacttgcct gttgaaggcg ggagcaacct agtcagtgtt gttagttctc 48780
cgaggccttt ctgtgctgag cctggtcctg tgtccctgc gagagcccaa gatcagagcc 48840
agggtccctc tcagatcacc tgcctccacc tccatcagct aaccgggctt gcgtggggct 48900
ggccaggggt cagtgtctcc tgggggaggg ctcccagagg cacaagctgt gtcatagggt 48960
gatgcacttc tgaagcagtc actcggaatg ggaaatcaga aaggaaacca gcctggagcg 49020
gctgaggctt cacttttgtg cagtggacac aagcgcagag gtgatgaccg gggaggacct 49080
gagatgcctg agcgcacgca gggctcttgg cccggagggtg atcagtcagc aagagcaatg 49140
ttctcagcca cgttgtaaaa gtagatttta agtaagtta ttatgataaa cactacgaag 49200
gattaggtaa cattttggac tctggagtgt actgatggtt ctcactctaa actccacttt 49260
atttttcttt caaaatttat cctcctactg tcattcccaa ataaactcca ctctaaaggg 49320
gaggtggcga gtttctcct cccaccgcgc cctagccctc ctctctgtc tgctgacacc 49380
tccgttcacc cacagcataa gggagctgtt gccattgaac cgaggggcag ccctcgacca 49440
agcccatagg gatgtagcag accaatgggc cgggggctgt gtccccgaa agccggggcg 49500
tcagcctggc aggcaacaag cgaggccct cctactcag cagagctgcc gtggcctgca 49560
cgcccatcct cccttgctag gagtctgttt tattttttg tactttcaaa atgagcatcc 49620



cccagacagt ctgcctggca tgattgatgc tgggggtgga agcttttcac agtccttggc 49680
ctctgaccct gtttcccag ggccggcggg cttctgcgcg cctgctgggg gccgctcggg 49740
catgtgctga cttegtgct gctcagagcc aggttttgta aacattcagg agccacttcc 49800
caggtcagca actgcgagcg ttttctgctg gtttgtaaga taagccttta accaagcttt 49860
atttctactt gcaataaagg atgatccact ctgggaggtt aaaataaagc gccctagggg 49920
cggcacagct ggcaatgcc aatctccga ctctgcttcc tgtaccgggt gtgcactacg 49980
tccgcacaag ctgggctccg acaggaagg gggatgcctc cgtgcccgtt gcacacacac 50040
acagaagggg cccaggtgct gcacagagct cccgtgtggg gccgagtgtt ggccctgccc 50100
gttcccgtg tgcttgccg ctggccgcag ctggcgagga ccatggacat tggcattgcg 50160
aagtgggccc tgcagtctgg aagcagagga ggaccagagc cccttcctcg acgcagcctt 50220
gatctccacg tgggtgatta aacatattag cagttaaagc agttaattgc tgtgcagggg 50280
gccccgctc attgtttgtc tctgaatcac ccgccacac caggtgtctc agataataga 50340
ctgggaactt cagtgaggag gatttcctgt ctgcagatgt gccgattaca gcgtgagtg 50400
aagacagtca gccagcactg ctgcgggctc gaattcgccc gctgagttaa ccagttgttg 50460
cctgaatccc tggtgtctc ggggagcagg gccaggtgg ggcctcctga gcaaagcct 50520
cccagtgcag gggcttctaa gtgcagttaa gtttagattt ggttttaaag aaggacaga 50580
ctgcctctgg actgcagccc tgaaaaactg gaagttgaga tcttcatgtg cccctttggc 50640
gtccccagcc cctctggatg gttctctgtc cctctcttga ggtgagatg ctgaaggctc 50700

tggcgtatcc ctccctgcac cacaggagtc ctgcccatgg ccagaagagc cagcagacac 50760
aggaggggac tcgctaaacc tgggggtccc acagccaggc agctgtttgtg cctgagtgcc 50820
agggaggggtg gccacaggtc tgcctggggc cttgtgatat ggcaggtgag acgagaccca 50880
gggaaggaat ccgtctggat cttaccccag ccaactgaagc tatttctctt ttgggcttta 50940
tcttagataa ctcagagatg tccacctgtg tgtaaaccag catcagagcc tgaaacacaa 51000
catgcatgga gcatgggagc ttggcttccc ggcttctctt tggcaccaca cagaggccac 51060
ccccacagcc tgccctgta tagtctcccc cacgtggcac gtgtgcctgg accacagcca 51120
gagagactgg ggtgccccagg agatgatgat gggggctggc ggtgccccagg aggggagctg 51180
ttgccagggt gggtgcagc cctgggctcc tctctccacc caggcactgt ttgttgcat 51240
gtacacggca ggcaactgtc ttgtctcagc tgtctcggc tgatggctcc cgtacaccgc 51300
agactcagct acacaagtcc ctgcggattg tccctctgtt gagtgccagg cagcaggaaa 51360
gggcagaaag caagaaccaa gctggggatg ggtgggagca tcctaagcct ggtgagaggg 51420
aaggggcggc tcctcctgga tgccctctgt gctggtgtgg gtgcagctgg ggcttagggg 51480
ccgcggtggg tgtggatgct gcccgggcga gggggctgcg gtgggcccac caggactgct 51540
ctcagggatg cgccttgctg cagctgcgtg aaaccaagtt tgtggctatg ctcttcccg 51600
tggggatggg cccagcagtg accctggcat ccacatgcct ccatgctctc aggttgaggt 51660
ggccatccct gagcaggtga cacggatcgg aggccctctt ttgatagtct aacacctttt 51720
tatttttagtg caaatttagt ttgtaattaa tgacatcaag agagacccaa atctgcctcc 51780

attgtgagtt tgatattttt tgaagtggg ccaagatgaa cattcatgga gctcttecta 51840
tgagcgggtg ctgcggcctt cccctccaca ccacgtggcc cggggcgtgc gctgctgctc 51900
ctgagacagc actgttggct cagccctagc tcatggtggt gtaaacacct cacagaggcc 51960
aggccagagt agcaggaggc agcgccctgt gcttaccac cagcctggtg ccccacgctt 52020
ggcttgaggg ctagttcaca cttatgtcca gagccacag ctatctgaca ggcagccgg 52080
cacctgcata catggttgc caactgggtc ttgttaccat gacaaattca gtacttaatg 52140
attagaactg agtggaacc aattaaaaa aaaagaaca catggtgaaa agtcttctag 52200
agataggtea gcaccattta tgcattattac catgcacct ctaatgtctg caggtgcctt 52260
ggggcagcca acctgttaca attgcaatta tgtaacaat tgtaaaggc cgggtgagg 52320
tggctcatgc ctgtaatccc aacactttgg aatgccaagg tgggaggatc atttgagccc 52380
aggagttaa gaccagcctg agcaacagag tgaaacctct ttcaaataa ttaataataa 52440
taataataat aataattgtt ttttgttgt ttttgagac gtgtctagct ctgttgccca 52500
ggttgagtg caggagcgcg atctggctca ccgcaacctc cacctcccga attcaagcga 52560
ttctcctgcc tcagccttcc aagtagctgg gattacaggc acccgccacc gcgccagct 52620
aatttttgta ttttagtag agacagggtt tcaactgtgtt agccaggetg gtctcgaact 52680
cctgacgtca tgatccgccc gcctcagcct cccaaagtgt tgggattaca ggcgtgagcc 52740
actgcaccgc gtctaataat aactgttaaa gcaataatga ccactcgcca cagagcacgc 52800
tccttctggt gggctctctg ggctgagct gggggctgcg ccgtactcca aggctgactg 52860

tggggtctta cacatcataa tgcacatagg cagcttgagt aggaaaggcc cttatgctgc 52920
ctgaggggaa gctcacccca ccccccaagg agccgccctg ggtatgagac atccctggaa 52980
cggcctaagg ggtccctggt ggctgctggc agtcacagca agtggccaat caggctccat 53040
tgaggcccag gggctcactc atttattcaa ctaacatggc gtctcgatgg gacctgaggc 53100
cagcagggca ggtgcgtccc ctccccctg gtgggctcat agctgcgggt aggggcccgg 53160
ggctcattga gaaggtgcga ttccagaaaa aaaaaaaaaa agaagataaa tattttaaaa 53220
taataagctt caagaatcta agtccagttc caaaggcata cgctcctctg tgcttggtcc 53280
aaggtgcctc actggggcaa gtggcaggcc agggcccgtg aggggtggctg gctctggggg 53340
ccacatgcct catgagacag tcgccagggt gccacaggg cctgtgtgtg aagccgtgcc 53400
cgctcgcat cgcccaccgg ccctggagcc tcccactccc acaccctcgt cctcaggcgc 53460
agtgccttggc cctggctgcc tctgtctgga tcacagccac tggetcacc tgctgtactc 53520
ctgctggcac ttacctctca cctggggcgc tgccctcttg ctcttctctt gggaaaatgt 53580
gtcccaggcg ggcgtgaaat cagagggcag gcctgttctt cccatcatgg atgagagagg 53640
cgcatgatac tgcattcggc tggccgtccc cgtgtccctg tgtccatcag aatagatggg 53700
agtgacccat ggtgactgtg tgggtggttt ttgggcttca gccttctctg gtccctcctt 53760
ggggccaggc tggttgaca agcatggtgg ctgcctcca tctcctgggc cattgacagc 53820
agctggtggg gctctcattg tgatcagagg agggctgcc tgcacggctg ttcttagcac 53880
tgccacaca tggagatggg ctgtcctgcg tcaggggtgc tgcactgctg gcctggggc 53940

tggaggcagc tccgggctgc agagatgctc agcccagtc ttcctgagtg tcagtgttgt 54000
gggccagcca cacatataca taggaagtga gcacgtccat ttgtacctgg aattactatt 54060
tttttggcag aaggacaaac tttgttgggc ccatcagccc caattctgaa ccaagtccag 54120
tgggcagcaa tgagaccac tttgtacca gcagagacat ctctgcagtg gcaggttcgc 54180
caacgtgcca gtggttgcca tctctgaagg gacgttcctt ggggcttgcg gccatactct 54240
gcaccatggt cagcagctct tctttgcctt atatgtagtg ggcatggcct gccttcagga 54300
tggttggtca gttcggccac ctctggctcc cacattgacc acagctctgt tggtgagat 54360
gatcctcttg gagggcagct tcatgtaagt cttcctggtt tccgggctag gggaggtgac 54420
tgcggtgtag ttctcaaagg cccaggctaa caagttccag tctcagctc tctccaggc 54480
agcgcttgat ggtacagtg tggcgcctgc agggaggacg ctgccgacgt ccagctgggc 54540
cctcttgcta cagtacacaa acagaaattg gcccggtgtg aggcccttgg tggatgga 54600
cagctctgtc tgtgcttaa actggtgtgg atcctggaga ccatctcagc aggggcatgt 54660
ccttcaaggt gcccttgatg tagctgtgcc gtcagctaa gtccacagca tgcaggccta 54720
tgagccctcc tgettcatgt gcacaaggaa cacagagctg gtgcccttcc tctgccacg 54780
aatcccgtgg cccacgactg ctcatgaata cagcctgaag agctgtacct ggaattttaa 54840
tgcccttgtc gtttgcagaa aatatgccag agtgtcatgt atccattacg taataagctc 54900
ttacaaagaa ggaacatggt gaagatgcct ataaatggat gagaaaaggc aggaactggt 54960
aatttacaaa agaggaaata cagttcataa acacgtggcc aaaaattact tcatttact 55020

agtcacaaa gaagtgcaaa ttaaagcagc atgacagaga gtgctgtgcg ccgcctgccc 55080
caggaaggaa cagagtctaa ggactgcctt gcgcccagaa gccccactc agctggccgc 55140
ccttcctttg agggctctgc ccaggaactc aactgacaca tggcaagctg gtgccccagg 55200
tctccatcct ggtggtgtct aggaagcaga gccttgagag tgctgtcctt accccaggag 55260
gggccattca gcagcacttg gcaaatgctg cactgggcac tccagagcca aggcttcgag 55320
gacggagctg cagggagcac agagccgccc catggggagg cctgcagtgg gccacaggca 55380
cagctgggaa agctctgagc acaacatgca gggcgaaaga caccggtgca ggcacccttc 55440
tttcctaaa tggcctgaat agtgcacatt tatcctggca taggagggaa atggtcggga 55500
gctgaccagg cacaactgct ttatcctggc ataggaggga aatggtgggg agctgactgg 55560
gcacagccac ctgcatcctg ctgtcacag cattcgggcc ccagtgggtc cccaccttgg 55620
cacaagtcgt ccaacctcct gcagggtcc aggcctgagc cagtagggcc taggacgcct 55680
gattggtgtt ccagcaccag caggagatc tggccttct ctggccactg cccagtcctt 55740
tgctcagcaa gaccatagt ggggctcagg gcctggtgtc ctgcatcag ggttgccac 55800
ggctaggac gtggcccccac ccaagtggag ctggcctctt cctgcaccc actcccagcc 55860
acgtcccacc agcccagctt ctaacccac tgtgcctcg gctgcctcc tcagggtga 55920
gcctgtgcc tgccacaggc cactcactct tcttttctg ttcattccg aagggtgtg 55980
gagtcctgc agggccaggc gtgtctgtc cgcgcagccc actctccct ggccatccag 56040
cctgtccagc tgtcatgcct ttcacattag tggtccatt acattccac cgacttcca 56100



gagtgatcca cagagcatgt gcggaagagt cctggctttg gatgggccac ctatttccat 56160
gcctctttta tctcttgtga ctacttttaa atttatcttt atttccttgc ggacctgggg 56220
acagggtttg gtcagcacct gcaaggtctg tagttgccat agtgccatag ttaccatgag 56280
gaacatgatg agtgctcttg gcttcccagg accagccagg caagcgtgca gaggagagt 56340
tgggtgcagc gtcagatgtt ctgttccggc acggagcagg caccaggaag tgctgggcct 56400
ggtgggctgg acaccaggtt ggagagggac cagacggctg agcgtgagcc cccggcctgc 56460
agggaccaca gcccctcctt cgtgccccag ccctgcccat ggggcccagc tcttctct 56520
gatgtgggct ggcatcccct gtgtctgggc tgatccccga ccggtgccag ccctcccggc 56580
acccaattcc tgcggtgag cagagcacag aggctggagc cggcctcccg caagctggct 56640
tagccaagtt ggtatgtttt gactcctgcc ccgggacagc agctggagac ttaagggttc 56700
cctctcacgg gagcttcagc ttccagatgc ttaggtgggc gccaccgca taccggccag 56760
cagctggttt gtcccagcca cgatgagcag gggagctatg cttttgaggc aaaattgcct 56820
tcgccattgg tggatcatcc tgagcccctg ggagccgaga gcacctgggg ttgggagga 56880
aaagctgctg tggccatccg ctggcctggc aaaatcacac ccatctgagt taggggagaa 56940
agggacctct gctggctgtt tggctatgaa gaggcccatg cggtgccctc tctccgggcc 57000
ccaggtgtg tggagactgg cagggggcag ctgtgctgac cccctggact ggccatcccc 57060
tgcccctctt ggctttgca cccaagagca ggatcagctg agccagctgc cccctagaat 57120
gggcacgggtg tagtttgac actgcccctt agctcagctc cccttgccc tgaggtctct 57180

aggctgggac tgtgtgccag gcagccacga ggggctgcag cacagagcag gtgggagacc 57240
cggctgctag ctctgtcac ctggccctct actagcgggt tacgggggct tgctttctcc 57300
taatggggag agacctcaa gccctacctg ggcagagggc cagatcccag gacttgagca 57360
ttgttggggc acagtccagg gtgtggctgg ctctcttca gcttgtccag atagggagga 57420
ggccattggg agccagcagg tgtcccttga aggaggcccc tctggactct tgaggcctgg 57480
gagctgatgg atctcactgc ctaatggtat caggctgtgg tgctgcagac agatgcaggg 57540
aggccaggca ggcagggtgc caacagctcc ccatgaaggc ctggtttctc cggatgaagt 57600
cagtaccaga gccactggca ctgtgctggt ggccctgcag cagggcctga ggcctgggca 57660
tgcggaagat tctggagtcc cgcgcttagc actctttgat gtcaggagc cccagcattg 57720
gcaagtgcct cttcctttcc cgcgtgccag gaaccagtct aaggccgact ccagtttcca 57780
ccggtggcac cctgccttg tctcctgtgc cggtgtcat ctgaccagtg tccgtttcag 57840
acctgcctgc cacctcctgc agaggccagg agcccccta cgctgctggt gcttcacatt 57900
tgccagttc taatggaca ttcttttttc ttgagacagt ctactctgt cggccaggct 57960
gaagtgcagt ggtgtgatct tggtcactg caaccgacac ctcccgggtt caagcaattc 58020
tcatgcctca cctcccaag tagctgggat tacgggtgca tgccaccaca cccagctatt 58080
tttgatattt taatagagac agggtttctt tcttttctt tctttcttt ttttttttg 58140
agacagagtt ttgtcttgt tgcgcaggct ggagcgcaat ggtgcaatct tagctcactg 58200
cagcctccac ctctgggtt caagcgattc aacctccga gtagctggga ctataggtgt 58260

gcaccactac gcctaggttaa ttttgtattt ttagtagaga tggggtttca ccatgttggc 58320
caggctgggtt ttgaactcca gacctcaggt gatccacttg cctcggcctc ccaaagtgtt 58380
gggattatag gcatgagcca tcacgccctgg ctgagacagg gtttcatcat gttggccagc 58440
ctggtctcga actcatgacc tcaggtgatt tgcccacctc gtctctctac agtgctggga 58500
ttacaggcag gagccactgc acccgtctc taagtggaca ttctgagaaa cagtttaaac 58560
acaaccgtc taggtcaaag ccactgaaga taacctttca gccccctc tgtttcttc 58620
aggtcgagtc ccagacacca gaagtctgaa tttggagaag gctgggtag atactagccc 58680
cgacactcag aagatcctgg tggactcccg ggaagccacc tctgtgcccc acatctacgc 58740
cattggtgac gtggtggagg tacggcatgc gtcccgggac cagggccctt gcccctgcct 58800
gtccaccac ccctgctcgc tgggtcccg ctgctgccgt cctgtaggag agaaacgaca 58860
ctttctctga tgacagaggc tctgggcaa accccagggc cagcctgtct ggagttctgg 58920
ggcaacctgg acatgggcct cggtctctg cttttcttt cttttctgtg gtgggagtgt 58980
ggatggfcta aagacagctg caagcaccag cagcagacgc ctgctgggaa tggggcatgg 59040
gtcagctctg cacgcaggcc tcaaccctg gcaggtaggc tagaggcata ggcttagaaa 59100
tgccaccatg gccttggggc cgtcctgtcc ccacagggtt gagaggcagg tctagttcgg 59160
gcccacctgg cccgcctc cccgcctcag tatcctctgg cttgcctctc tgggcatcac 59220
accggggcag gtcctttgct ctgagctgct gctgctgctg tgaagtggag accggtgcca 59280
gtctttcctg ggtgggggct ctggagccct cttacacat ggccccagta agggactgtg 59340

gtggtcagtc ttgggatact gcacctggc agcctcagga gtgctcggcc tgtcctgcat 59400
gtgtccagea cctgctgctg aaagtggctc tggagggtcg ctgagagctt cttttagcg 59460
agacctgtca gtgtctgctg cctggggctg tggtagcaaa tcaccacaca cgggtggccc 59520
agaacaacag acatggatta tctcacgttt ggggggcagt agtctgaaat gaaagtgtca 59580
gctggggctg ggtgcagtgt ctcatgcttg taatcccagc actttgggac tccgaggcag 59640
gcagattact tgaggtcagg agttcaagac cagcctagcc aacatggtga aaccgtctct 59700
actaaaaaaaa taaaaaaaaatt agccaggcgt ggtggcacgt atctgtaatc ccagctaccc 59760
gggaggctga ggcaggagaa tcatttgaac tcgggaggag gaaggcggag gttaccgtga 59820
gccaaagattg tgccactgca ctccagcctg ggtgacagag cgagactcca tgtcagaaag 59880
tgtcagctgg gccaggtcc ctcggaagcc tctgggtag gatgccccag gcgtccctcg 59940
ggttgtggct atatcactcc tctctctgcc tcacgtcat gtgacagtct cctgggtgtg 60000
tctctgggcc ctgatttggc tcttacagtt tctctgcaat tggacttagg gtccacccta 60060
atccaggatg acttcatttc catccttacc ttaattgtat ctgcaaagat cttatttcca 60120
aataaggtca cactctgagg ctccaggcag acctgcagg gtctgttagg gcccatctag 60180
ccgacccgat tgtgtggaca gagcatgtgg ctccatgtgc ctgagccacc ctgagcccc 60240
agcttgctta gctggatggt tcagctgctc agtgatttct gcaagcgcag cctctgcctg 60300
tggaccatgt aggtgcagtg gtctctggtt gcagggtctg ttgaatcctg tgggcgctgc 60360
acctgagac agtgccatgt gcatctctgt gcacagcggg aagcctccct tctgtctggg 60420

aatctgagtt ttccctctgc aagtgtgtag ctcccaggct cctgtgttg aaactggaac 60480
atttcaaacc gttttgccag aaatgcatgg cgcacacaaa ggcattcttt atttaaacad 60540
taaatccact ctgtcagaaa ggtcgttctg aatagtccaa agagttaaca cccaaccagt 60600
ggtcccttga gggctggga agagcctgtg ggcggggcgg gggctattgt ttaatgagat 60660
gttgtgtgct gtgcgccgcc cgccgggatg tttccgtagt tagtcaggcc tgctggaatg 60720
cgcaggetgc gctctgagtt tatctccacg gatctctatg catttctgga atgcaaaaca 60780
acatctgcat ttctgtctgc catggtgatt ggcagcccat ccagaggac ggtgctggaa 60840
cccccaaggc tgggcacacc ctgggacgga gggatctcca gcacagcgac attctgattt 60900
ggaatttggt atggactgtg acgtgcagat caagctgcac gtcaggagca catggaacgc 60960
tttgggtcc ctttttagcc ggggattcca gtgaatgaaa acggtagcag gggctctttt 61020
gagcttggtc atggggcagc cctccgaggt cagcaatgtg cagaaggggt ttggagagaa 61080
ggcttgagca tgtgagggtg gcacggccag cctcatcagc agcggactcc tttcccaggg 61140
cagagtggag ggcagcaaac aggagaatga gcaacctacc taggtccttg ggatgccct 61200
caggaggacg agctctaggg ggaatgctgt acgtcaccat gctcggtgcc agtggtggg 61260
attttctaaa gggagatgcc cactcggagg gcaaagggtg atggcatagg ggctgcatat 61320
aaccgccgac atggtgctga cgtggcccc ctgtgccttc cccaaggggc ggctgagct 61380
gacaccaca gcgatcatgg ccgggaggct cctggtgcag cggtctctcg gcgggtctc 61440
agatctgatg gactacgaca atgtgagttc tctagcagga cgccacgtgc agcctaggac 61500



aggctgagtt cgaggctagc tcttctgggg tgaggggcct ttgtgcgctg tgtgtctgca 61560
tgtagatgtg ggcattgcgtg tgtgtgcgct tatgtgggtg tgtgtacac acgtgtgtgt 61620
gcatgcatgg gtgtgtggct cagttctgag agtgtggcgc aggcgtgggc aggtgggtcg 61680
cctactgtgc ttgcagcctg ctctgggcgc atctggctct ggtctgtgat cgtgtctctt 61740
tgtgtcacat gcagtgggga acttcggttt tcggggccca agggccctcc ctgactccag 61800
acctgcttcc aggttccac gaccgtcttc acccactgg agtatggctg tgtggggctg 61860
tccgaggagg aggcagtggc tcgccacggg caggagcatg ttgaggtgag gcctgggagc 61920
agcacagctg aggacagtgg cgactccacg acctacccc atgctctggg cggaggcctt 61980
gtgagcaggg tgccaagtc tctcctttcc agggggcctg agcagtggct gtgtgtagcg 62040
ggaagggaca cgttgggggc agcctcagaa gtgggggtgc ctgggctttg gcagccttgg 62100
ggtgactggg cttaggtgcc tctggtctct gccaccatgt gtcacagcag tgaggggaag 62160
gcccttggtt gccttgttct gagggcaagg agaagccctg tggcccagaa gccccagcc 62220
ccacccagc catgctgcag gggtgcccag caccagcagg gtcaccacca cggtgccacc 62280
cgctccctg ctgaggtcag ctgagcactg gcccactcc agcacacagc agcttgtccc 62340
tgaaagcacc agggccccga agatgcctct gtgctgtccc caccttcag ggccatgaat 62400
ctcactctac ccagaaaagt ttctcccagg ggctccgac ctctgcttcc accccaccc 62460
ccccaccac cctgcacctc gtcttcttgg actgccagg gtttctcca ggcgagagcc 62520
ccccgcccc cgccccccac cacatcctga taccatcct cttccagctt cttccaggt 62580

caggcactca cccttgagga aaggggtttt catcgagcaa gcctgctttg ggggtctgct 62640
ctggcaggtg gctgtggctc cggggtggcc tggagggatg cgggggctct gaagcctgcc 62700
gggccgtggt agctggaagc cttcggtgcg gtttcatctt gctgccgctg cagcttgacg 62760
gcacccagag aaaccggagc ctgcagcctg ggcggtgggg cctgcggcct ttggggatga 62820
gacactgggc tccagggtg gcccttccc cctgcacccc agaactctcc atcaacagga 62880
cgggcctgac aggccagcct tccccagagc actttatttg ctatttttgt ttgattcatc 62940
acaagtgtgc tgggacatat gttcctggca tttataatg ttgtttatg tttcacaatg 63000
ttgaatggcc aaatactctg ttgttttct tttcaattct gtcttagtta gaacaatatt 63060
ctctgaagtt ccattaatta ataatggctg tacagcacat gtgagggccc cactcatttt 63120
ttacttggcc gcagccccgg acacgctgtc gagcccttca ggggtgctga aagcctttgt 63180
ccaacagctc cggctccggt gtggccacag cggccttgct ccagtgaggg ccaagcaaac 63240
accagggtgc ctgagggagc ccagggtggc tctgtctcac ccattcttgc ctccaccatt 63300
tgttgtgggt gagctacgtc caccaggtt tgctgtgcct ggccctggctg cttggattgc 63360
ctgatgcctg ctctgtctgt gtggtttacg ggggtcccag gcctgggtgg gacagggtct 63420
gtcctgcaga gcatggctcc agccactggc tgctgcacg tgagagggcc tgcacacacc 63480
ccgtggccag ccaagccctc atccccatcc cagaccagac cttcaggcca gatggatggt 63540
tctgccccgc catgaccctg ccttgcccat gcagcctgtg ggagctgcag gtgccacgag 63600
gtttgtttgt cgcagcactg atccagggtt ggtatcctgt cctcaggtct atcacccca 63660



ttataaacca ctggagttca cggtaggctgg acgagatgca tcccagtgtt atgtaaaggt 63720
gagcatccct gtggcccagg gtgctgagga tgagaggag ggtggcaaag agcctggcag 63780
ggtgaacacc cgaggactgg cccacccat gcctcccagg cagggtgcag ggtggatgca 63840
gggtggacgc aaccagccc cctcctgggc tggtaggctga gatgtgggc tttcagatgg 63900
tgtgcctgag ggagcccca cagctgggtgc tgggcctgca tttccttggc cccaacgcag 63960
gcgaagttac tcaaggattt gctctgggga tcaagtaagt cccaggaat gcaggctgcg 64020
atgcgatgtg cagctgggta tccctcgagt gccggcagtc ctacagtga gagctgctgc 64080
cactcttgcg gcatttatgt ggccttcgtg ggtttgcagc agagattcct caggcccctc 64140
agacagggcg ggttttaggg ggacaagagg cggttctgcc ccagccagac gctgttgagc 64200
cagccagagc caggtgaggt gtcccctgtg gcccgggtc gctgctaggg cccttgccca 64260
cctggccaag caccagcca ccatgagcag agtgccagta cctggagagc caccacagg 64320
ctgctgtgtg tcttctggag ctggggccat tgcctgggtc ttgggctcag gctgtgtgtt 64380
ttcggggtcc cggggtcaaa ggaagccatg gcaaaggctc tgggtgggtt gacaggggta 64440
gttgaggtt gggacattgt gcatggcctg agagaggtgg ctggctggat gtggggcctg 64500
ggaggtggtg gtgtggtgag gccaggatgc gctgtctgtg ggtaaagcag agagcagagg 64560
cctaaggcag gactgtgcct agcaggggag gatggaacag caggaagcca ggccagggca 64620
agccagggcg tggctgggtg ggaggtgggc tggacgagca ctaggcatct gctgggaggg 64680
aggtgatgg caccacggg tgtgggcagg ggtcctggct gctggctggg ggtcagggga 64740

cagtgaggag accagcagcc tctgaggccc tctcttccc gggggtggga tgctgtggac 64800
ccccctccct gtgtgaccc cgctgcctc ccccatcccc catgtgcagg tgtggggctt 64860
cctatgcgca ggtgatcgg accgtgggta tccatccac atgctctgag gaggtagtca 64920
agctgcgcat ctccaagcg tcaggcctgg accccacggt gacagctgc tgagggtaag 64980
cgccatccct gcaggccagg gcacacggtg cggccgcgc cagctcctcg gaggccagac 65040
ccaggtatgc aggtggggct ggctctgttt gaggacaggg catgtggcag gggcgcagga 65100
gcctggcca tgggtccct ccaggtgtac agcaaggcta cacctgccac gccaccaga 65160
atgggtgctc catctgtaa ccaggccaca gcggtgacag gcagaagggg aagttcccag 65220
gggccccaaac ctccccggg gacccagac ccggcctgg ccacagctgc tccccacaca 65280
caggaggtat caagaaacgg ggctcactt tagcagcta tcccagggtg atgttgcggt 65340
ggaaggtgtc cgggtgggc taaagtcggg catctcaagt tgtgcccc cagggggctg 65400
cagtcgggaa gctggcctcc caccaggcc tcccaccaag gcctggctcc tgcagagttc 65460
agcggcgct catttccta tctccagaa ggtggagacg ctgccctgtg atggccggcc 65520
ctgccagcc tgccctgcac atctggttct gttccagctc tgcagagcca ggctgaccgg 65580
ggggcatgtt gttcatcgtg acctctctg gggaggaaga aactggcaag ggctcctggc 65640
ctctgcccc gggatgcctg tgccagagcc cctcgcctc gtggtctaat agtgcactct 65700
ccggcctggg ctgcaggca ggggccggg cagggtgggc cctcagccc tgccatccag 65760
cccacctggg gcaccccat ggctgtcagc cctcccagg gttggggtgt ttgggtcca 65820



tctctcccc ggggctgagg tggagaccag gcagagcagt gggctcccc caagatgcct 65880
gtggacaggc tctagggctct gcatggcgcc gaggggctct ggggaggcct ctctgggggt 65940
actcagggcc cctgtcttca ccgtggccgc ctccccccgg cggggccgcg ctcgataggg 66000
ataaaciaag ggcacctga ggaaactctt atcagaacat tacacctccc agagctgttt 66060
tgttaggagc ctgtataaa ttttatcat ttcaaatat tttgtagca ccgcgtcgt 66120
ccctgtgacg catgcacctg ggggtggggc attctctgt gggtttattt ctcacccatc 66180
tcccttgggg gtccctgggt gtggcagtgg gagacatagc taggctgatg tgagggtgg 66240
gtggctgacc tgtctgacc ttctgttgt tggcaggatg gctgcaggcc aggtttgggg 66300
ggcctcaacc ctctctgga gcgcctgtga gatggtcagc gtggagcgca agtctggac 66360
gggtggcccg tgtccccac agggatggct caggggactg tccacctcac cctgcacct 66420
ttcagccttt gccgcgggc acccccccca ggctcctggt gccggatgat gacgacctgg 66480
gtggaaacct accctgtggg cacccatgtc cgagccccct ggcatttctg caatgcaaat 66540
aaagagggtg ctttttctga agtgtg 66566

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05983

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/53, 9/02, 1/21, 1/19, 1/15, 5/10,
C07K16/40, C12Q1/26, 1/68,
G01N33/50, 33/15, 33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ

PIR/SWISSPROT/GENESEQ

BIOSIS/WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X P,A	J. Biol. Chem, 274(35), August 27 1999 Qui-AnSun et al., "Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase", p.24522-24530	1-17,19 18
P,X P,A	Eur. J. Biochem., 261(2), April 1999 Antonio Miranda-Vizueté et al., "Human mitochondrial thioredoxin reductase. cDNA cloning, expression and genomic organization", p.405-412	1-17,19 18
P,X P,A	FEBS Letters, 442(1), Jan. 8 1999 Pamela Y. et al., "Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase", p.105-111	1-17,19 18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 January, 2000 (25.01.00)

Date of mailing of the international search report
08 February, 2000 (08.02.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05983

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X P, A	Database Medline on PubMed, US National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), No. 10462449, Gorlatov SN., et al., "Human selenium-dependent thioredoxin reductase from HeLa cells: properties of forms with differing heparin affinities", Abstract, Arch. Biochem. Biophys, 369(1), p. 133-142, Sep.1 1999	1-17, 19 18
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93(3), Feb.6 1996 Takashi Tamura et al., "A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity", p. 1006-1011	1-19
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(12), June 11 1996 Vadim N. Gladyshev et al., "Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene", p. 6146-6151	1-19
A	FEBS Letters, 373(1), Oct. 2 1995 Pamela Y. Gasdaska et al., "Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase", p. 5-9	1-19
A	J. Biol. Chem, 273(15), Apr. 10 1998 Liangwei Zhong et al., "Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue", p. 8581-8591	1-19
A	GENOMICS, 37(2), Oct. 15, 1996 John R. Gasdaska et al., "thioredoxin reductase gene localization to chromosomal position 12q23-q24.1 and mRNA distribution in human tissue", p. 257-259	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/53, 9/02, 1/21, 1/19, 1/15, 5/10, C07K16/40, C12Q1/26, 1/68, G01N33/50, 33/15, 33/566		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/00-15/90		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ PIR/SWISSPROT/GENESEQ BIOSIS/WPI		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	J. Biol. Chem, 274(35), August 27 1999 Qui-AnSun et al., "Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase", p. 24522-24530	1-17, 19 18
P, X P, A	Eur. J. Biochem., 261(2), April 1999 Antonio Miranda-Vizuet et al., "Human mitochondrial thioredoxin reductase. cDNA cloning, expression and genomic organization", p. 405-412	1-17, 19 18
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 25. 01. 00	国際調査報告の発送日 08.02.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内田 俊生 印	4 B 9838
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

09/830,706

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05983

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	FEBS Letters, 442(1), Jan. 8 1999 Pamela Y. et al., "Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase", p. 105-111	1-17, 19 18
P, X P, A	Database Medline on PubMed, US National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), No. 10462449, Gorlatov SN., et al., "Human selenium-dependent thioredoxin reductase from HeLa cells: properties of forms with differing heparin affinities", abstract, Arch. Biochem. Biophys, 369(1), p. 133-142, Sep. 1 1999	1-17, 19 18
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93(3), Feb. 6 1996 Takashi Tamura et al., "A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity" p. 1006-1011	1-19
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(12), June 11 1996 Vadim N. Gladyshev et al., "Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene" p. 6146-6151	1-19
A	FEBS Letters, 373(1), Oct. 2 1995 Pamela Y. Gasdaska et al., "Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase" p. 5-9	1-19
A	J. Biol. Chem, 273(15), Apr. 10 1998 Liangwei Zhong et al., "Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue" p. 8581-8591	1-19
A	GENOMICS, 37(2), Oct. 15, 1996 John R. Gasdaska et al., "Human thioredoxin reductase gene localization to chromosomal position 12q23-q24.1 and mRNA distribution in human tissue", p. 257-259	1-19